

ACTA

PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

4.

2010

APHGAO 80, (043) 129–180. (2010)



A MAGYAR GYÓGYSZERÉSZTUDOMÁNYI TÁRSASÁG
ELNÖKSÉGE,
A TÁRSASÁG TITKÁRSÁGA
ÉS AZ ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA SZERKESZTŐI
KÖSZÖNTIK KEDVES OLVASÓINKAT.



Boldog Új Esztendőt,
valamint szakmai törekvéseik
megvalósításához sok sikert kívánunk!

ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

<i>Antus Sándor: Biológiaiilag aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009 között IV. rész</i>	131
<i>Baska Ferenc, Szántai-Kis Csaba, Greff Zoltán, Marosfalvi Jenő, Varga Zoltán, Kéri György, Órfi László: P21-aktivált kináz gátlók vizsgálata „in silico” módszerek felhasználásával</i>	155
<i>Inotai András, Merész Gergő, Kaló Zoltán: A magyar gyógyszerkiadások nagyságának értékelése</i> .	162
<i>Kádár László: Az inhalációs kezelés jelentőségéről és az inhalációs eszközökről</i>	173

CONTENTS

<i>Antus, S.:</i> Investigation of biologically active compounds at the Department of Organic Chemistry of University of Debrecen between 1992-2009 part IV.	131
<i>Baska, F., Szántai-Kis, Cs., Greff, Z., Marosfalvi, J., Varga, Z., Kéri, Gy., Örfi, L.:</i> Development of PAK1 kinase inhibitors with „in silico” modeling methods.	155
<i>Inotai, A., Merész, G., Kaló, Z.:</i> Assessment of the pharmaceutical expenditure in Hungary	162
<i>Kádár, L.:</i> Importance of asthma inhalation therapy, the used devices.	173

Acta Pharmaceutica Hungarica: www.mgyt.hu

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu
Felelős kiadó: Prof. Dr. Vincze Zoltán

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001-20530530

Adószám: 19000754-2-42

Előfizetési díj egész évre: 5133 Ft + 257 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 930 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: Arrabonaprint & Partners Zrt. (Felelős vezető: Ványik László)

Index: 25 101

Biológiailag aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009 között IV. rész¹

ANTUS SÁNDOR

Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék, 4010 Debrecen, Pf. 20
és MTA Szénhidrátkémiai Kutatócsoport, 4010 Debrecen, Pf. 59

E közleménnyel Lempert Károly akademikust 85. születésnapján köszönti a szerző

Summary

Antus, S.: *Investigation of biologically active compounds at the Department of Organic Chemistry of University of Debrecen between 1992-2009 part IV.*

The author reviews the beginning of the application of the methods of structure elucidation by spectroscopic (metric) techniques at the Department of Organic Chemistry of University of Debrecen and summarizes the most important results obtained in this field between 1992-2009.

Összefoglalás

A szerző ismerteti a műszeres szerkezetvizsgálati módszerek kezdeteit a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén és összefoglalja e területen 1992-2009 között elért legfontosabb eredményeket.

1. Bevezetés

Bognár Rezső (1913-1990) akadémikus 1950-ben került Debrecenbe és a Zemplén intézetben megkezdett flavonoid- és szénhidrátkémiai kutatásait a régió gyógyszergyárainak fő profiljához illesztve az alkaloidok és az antibiotikumok kémiájával szélesítette ki. Bizonyos tekintetben azonban szakított az „alma mater” szellemiségével. Nem elégedett meg ugyanis az anyagigényes szerves analitikai módszerekkel (fizikai állandók, elemi összetétel, metoxi-, acetoxi-, *N*-metil- és az egyéb funkciós csoportok meghatározása stb.), hanem rövid idő alatt megteremtette a vezető nyugati egyetemeken már egyre szélesebb körben alkalmazott, és a korszerű preparatív szerves kémiai kutatásokhoz nélkülözhetetlen ultraibolya és látható spektrofotometriai (UV-VIS), valamint az infravörös spektroszkópiai (IR) vizsgálatok személyi és infrastrukturális feltételeit [1, 2]. Az 1970-es évek elején ráértett a kvantumkémiai számítások szerves és gyógyszerkémiai alkalmazásának jelentőségére is [3]. A kiterjedt nemzetközi kapcsolatai révén és a külföldi tanulmányútjain – közöttük az 1958-ban Dublinban (*prof. dr. E. M. Philbin*, Institute of Organic Chemistry) eltöltött 4 hónap alatt –

szerzett tapasztalatai pedig arra ösztönözték, hogy a kutató munkáját mielőbb a mágneses magrezonancia spektroszkópiai (NMR), a tömegspektrometriai (MS) és a kiroptikai spektroszkópiai (ORD, CD) vizsgálatokkal is segítse.

Az utóbbi vizsgálatok gyökerei – szigorúan tekintve – a Zemplén intézetbe nyúltak vissza. A szénhidrátkémia egyik alapvető kérdésének, a glikozidos kötés térállásának meghatározásánál a glikozidáz enzimekkel végezett kémiai vizsgálatok mellett ugyanis a nátrium D-vonalán ($\lambda = 589.3\text{nm}$) mért fajlagos forgatóképesség mérését is használták. Ez a fizikai adat a molekula kiralitására jellemző optikai rotációs diszperzió görbe (ORD: moláris forgatóképesség változása az UV és látható tartományban) egy pontja és az oldószertől függő előjeléből és abszolút értékéből a glikozidos kötés térállására lehetett esetenként helyesen következtetni. Ezen összefüggés alaposabb tanulmányozása kapcsán a 19. század utolsó évtizedében már számos empirikus szabályt ismertek fel. Ilyen a szénhidrátok körében megfogalmazott ún. Hudson szabályt is [4], melynek *O*- és *N*-glikozidokra történt kiterjesztése tekinthető a debreceni kiroptikai kutatások első eredményének [5]. Az 1960-as évek közepén a nyugat-európai és a tengerentúli vezető intézetekben azonban egyre inkább az ORD vizsgálatok kerültek előtérbe, de egy évtizeddel később szinte már csak az elektronikus cirkuláris dikroizmust [ECD: a moláris abszorpció]

¹A dolgozat első részében [Acta Pharm. Hung. 79, 95-103 (2009)] a tanszék történetéről és az alkaloidkémiai, a másodikban [Acta Pharm. Hung. 79, 143-167 (2009)] a flavonoidkémiai, a harmadikban pedig [Acta Pharm. Hung. 80, 3-17 (2010)] a szénhidrátkémiai kutatásokról számoltam be.

koefficiens különbségének ($\Delta\epsilon$) változása UV és a látható tartományban] használták az optikailag aktív anyagok jellemzésére és az abszolút konfigurációjuk meghatározására. E terület rohamos fejlődését tükrözi, hogy ezen években e módszerek szerves kémiai alkalmazásáról már több kitűnő kézikönyv is megjelent [6]. Az 1967-ben a könyvével a fiatal bonni, majd ezt követően bochumi professzor, *Günther Snatzke* (1928-1992) is nagy nemzetközi elismertséget szerzett és a hazánk iránt érzett különös vonzalma, csodálatos kapcsolatteremtő képessége és nem utolsósorban *Kajtár Márton* (1929-1991) professzorral (ELTE) 1965-ben kötött, és az egész életüket végigkísérő mély barátsága meghatározó szerepet játszott abban, hogy e kutatások hazánkban is elkezdődtek. *Snatzke* professzor első debreceni látogatásán (1968) a kiroptikai jelenségek mérésében rejlő lehetőségekről tartott kitűnő előadásával *Bognár* professzor úr érdeklődését is felkeltette és hamarosan szoros barátság és sikeres együttműködés alakult ki [7] (1. ábra). E mellett *Bognár* professzor úr támogatta *dr. Lévai Albert* adjunktus kezdeményezését is, és a Szlovák Tudományos Akadémia Kémiai Intézetének (Pozsony) kiroptikusaival tanulmányozták az izoflavon- β -D-O-glikozidok és rokon vegyületeit kiroptikai sajátosságait [8]. 1984-ben a Bochumi és a Debreceni Egyetem együttműködési szerződést is kötött, melynek keretében nemcsak a Szerves Kémiai Tanszék és az MTA Antibiotikum Kémiai Kutatócsoport (7/9 fő), hanem a Biokémiai Tanszék oktatói közül 7 fő rövidebb és hosszabb ideig a bochumi egyetemen dolgoztak és így *Snatzke* professzor haláláig (1992) eredményes kutatómunka folyt e területen [9].

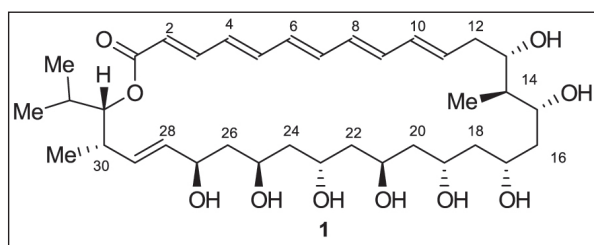
Az abszolút konfiguráció (konformáció) kiroptikai spektroszkópiával történő meghatározása a kiralitás centrum(ok)hoz kapcsolódó csoportok relatív térhelyzetét illetően a röntgen vagy / és az



1. ábra: *Bognár* és *Snatzke* professzor debreceni eszmecsereje (1968)

$^1\text{H-NMR}$ színkép adataira támaszkodik. Az utóbbi módszer egyedülálló potenciálját kémiai szerkezeti problémák megoldásában a szerves kémikusok már 1960-as évek elején felismerték és a legendás Varian A60 megjelenését (1961-ben) követő pár éven belül az Egyesült Államokban, de Nyugat-Európában sem volt már olyan említésre méltó szerves kémiai intézet / laboratórium, ahol ne lett volna NMR spektrométer. E módszerrel *Bognár* akadémikus a széles körű nemzetközi kapcsolatai révén 1963-ban ismerkedett [10] meg és a fiatal munkatársát, *Szilágyi*

Lászlót (1941-) 1966-ban Gif-sur-Yvettebe (CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles) küldte, hogy gyakorlati ismereteket is szerezzen e területen. *Szilágyi László* a tanulmányútjáról hazatérve – mintegy demonstrálva, hogy nem fecsérlete hiábavalóan az időt – lelkesen tájékoztatta a Professzor urat, hogy sikerült e módszerrel a flavofungin (1) egyik lebontási termékének a szerkezetét meghatározni, melynek felderítésével a tanszéken már több éve sikertelenül próbálkoztak (2. ábra). Minthogy ezt a szép sárga (flavus) tük formájában kristályosodó antifungális makrolid antibiotikumot Debrecenben izolálták [11], így ez a téma *Bognár* professzor úr szívéhez igen közel – ha nem a legközelebb – állt. Ezt követően ezért minden tekintélyét és kapcsolatát latba vetette, hogy mielőbb egy Varian A60-as NMR spektrométer kerüljön a tanszékre. Az akkori helyzetben (deviza-ínség itthon, embargo az USA-ban, az egyetem / tanszék nehéz költségvetési helyzete stb.) az egyetemek és az akadémiai kutatóhelyek közötti érdekérvényesítési harcok mellett ez azonban nem volt könnyű feladat. A küzdelem 1971-ben végül nagy sikerrel zárult, és a 60 MHz-es spektrométer helyett az ország első 100 MHz-es NMR-jét (JEOL MH-100) telepítették a tanszékre. *Bognár* professzor úr a laboratórium vezetésével *Szilágyi Lászlót* bízta meg, aki akkor tért vissza második franciaországi tanulmányútjáról. Ezúttal Strasbourgbán, a későbbi Nobel-díjas *Jean-Marie Lehn* (1939-) laboratóriumában mélyítette el ismereteit a nagy lépéssel fejlődő NMR spektroszkópia területén. A laboratóriumát rövidesen elárasztották igényeikkel a KLTE kémiai tanszékei mellett más intézmények (pl. DOTE, Biogal, ÉMV, Chinoin stb.) kutatói is, mivel az MTA Központi Kémiai Kutató Intézetében (MTA KKKI, Budapest) telepített Varian



2. ábra: Flavofungin (1) szerkezete

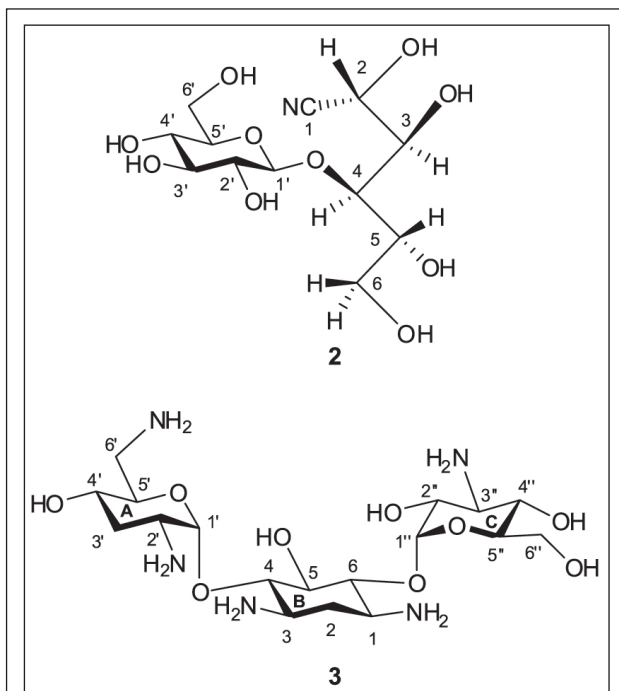
XL-100-as spektrométer beüzemeléséig (1973) hazánkban csak itt lehetett 100 MHz-es méréseket végezni.

A színvonalas szolgáltatás mellett Szilágyi professzor a kezdettől fogva az NMR spektroszkópai kutatás elindításán fáradozott. Az első eredmény a nyílt láncú szénhidrát-származékok konformációs vizsgálata kapcsán 1973-ban született, melyet hamarosan több is követett [12]. Az NMR spektrumanalízis pontosságának és megbízhatóságának növelésére – nem kevés erőfeszítéssel – 1975-ben bevezették az akkor modern iteratív számítógépes eljárásokat is [13]. Az NMR módszer a molekulaszerkezet mellett igen széles tartományban (ca. 10^{12} – 10^2 s) a molekuláris mozgások (dinamika) vizsgálatára is alkalmas. Ezt példázza, hogy a Lehn-laborban elsajátított deutérium-relaxációs módszer innovatív alkalmazásával a lizozim – *N*-acetilglükózamin (NAcGlc) enzim-inhibitor komplex dinamikáját határozták meg. A vizsgálathoz szükséges deutérium-jelzett β Me-NAcGlc-t nagy szintetikus felkészültséggel acetontól kiindulva „rakták össze” (acetone \rightarrow ketén \rightarrow + D_2O \rightarrow ecetsav- d_1 \rightarrow d_1 -Ac $_2$ O + glükózamin \rightarrow d_1 -NAcGlc \rightarrow α Me- d_1 -NAcGlc, β Me- d_1 -NAcGlc) [14]. Kísérletek történtek az NMR-spektroszkópia biofizikai alkalmazására is [15]. Az ún. „100-as korszak” egyik legtöbbször idézett eredménye a cisztein-aldehid reakciók dinamikus NMR és deutériumjelzés segítségével végzett vizsgálatához fűződik [16].

Az NMR metodikában a 70-es évek elején nagy áttörést jelentett az impulzus-Fourier módszer (FT NMR), majd 1977-ben a 2D (ill. többdimenziós) spektroszkópia elvének bevezetése. A 4 évig tartó fáradozás után, 1981 őszén a kémiai tanszékek és az iparvállalatok (Biogal, Alkaloida) összefogása, valamint Pungor Ernő akadémikus (1923-2007) által vezetett OMFB támogatása révén sikerült elérni, hogy Debrecenben helyezték üzembe az ország első szupravezető mágnesű NMR spektrométerét (Bruker WP200), amely ezt követően több mint negyed századon át szolgált a debreceni kémiát és a velünk kooperáló partnereket.

Ezen időszak alatt az NMR-csoport személyi állománya is öröndetesen gyarapodott. 1979-ben a friss diplomás okl. vegyész Erdődiné Kövér Katalin (1956-) a Biogal Gyógyszergyár alkalmazottjaként, 1980-ban pedig Batta Gyula (1953-) okl. fizikus a tanszék munkatársaként került a NMR laboratóriumba, ahol mindketten már egyetemi tanárként nemzetközileg is elismert NMR kutatásokat folytattak.

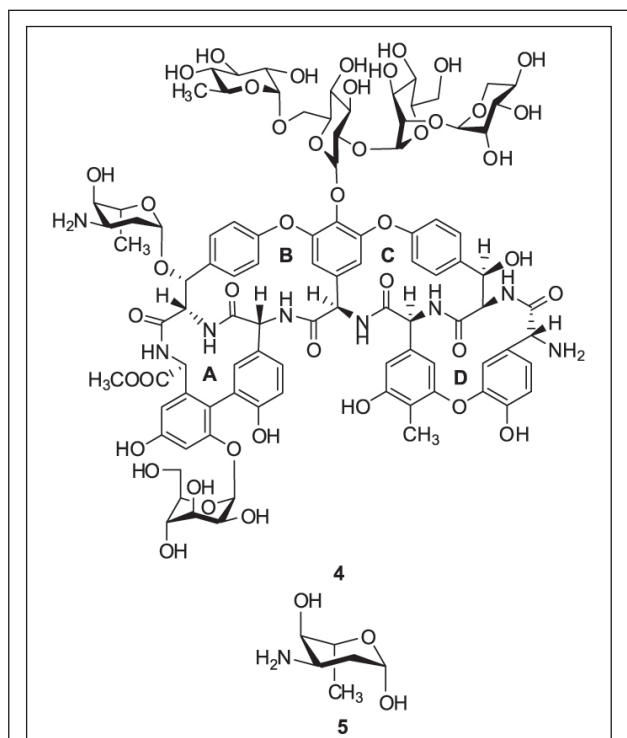
A csoport tudományos érdeklődése 1981 óta, a



3. ábra: Cellobionitril (2) és a tobramicin (3) szerkezete

műszeres háttér lehetőségeit kihasználva a széles távlatokat megnyitó 2D módszerek alkalmazása területén koncentrált. A különböző 2D-technikák célszerű kombinálása lehetővé tette például a cellobionitril (2) ún. abszolút 1H - és ^{13}C -jelhozzárendelését [17]. Szintén a szénhidrát származékok szolgáltattak modell vegyületül az egy-kötés ^{13}C - 1H csatolási állandók és a térszerkezet közötti jelentős érdeklődést kiváltó összefüggés felismeréséhez [18], és nagy érdeklődést váltott ki a gyógyszerként alkalmazott fontos aminoglikozid antibiotikum, a tobramicin (3) elsőként közölt 2D-módszerek és iteratív számítógépes analízis segítségével végzett teljes *ab-initio* 1H - és ^{13}C jelhozzárendelése is [19] (3. ábra). A 2D (majd később nD) NMR technika teljesítő képessége a fehérjék szerkezetének atomi szintű meghatározásában csúcsondott ki, melynek alapjait 2002-ben Nobel-díjjal jutalmazott K. Wüthrich (1938-) fektette le [20]. Szilágyi professzor 1987-89 között a kaliforniai Stanford Egyetemen tett tanulmányútja során ismerkedett meg mélyebben ezzel a tématerülettel és az NMR kémiai eltolódások és a fehérjék másodlagos szerkezete közötti összefüggést leíró dolgozatai igen hamar már nagy érdeklődést váltottak ki [21].

A nemzetközileg is elismert kutatások és igényes „szerviz tevékenység” mellett 1974 óta a gyógyszeres számára kötelező féléves kurzus, ill. gyakorlat formájában eredményes folyik az NMR spektroszkópia oktatása. A magyar nyelvű szak-



4. ábra: Risztocetin A (4) és az L-ristozamin (5) szerkezete

irodalom hiányát Szilágyi László két egyetemi jegyzettel [22], majd később a témában elmélyedni kívánók számára írt elméleti aspektusokkal is foglalkozó könyvfejezettel [23] pótolta. Számos diplomamunka és PhD értekezés is készült e témakörben, és az NMR operátori továbbképzést sikerrel teljesítő hallgatók pedig megkapták(ják) a jogot az önálló NMR mérések végzésére. Oktató munka színvonalát tükrözi, hogy a legtehetségesebb hallgatók közül többen [Forgó Péter (MSc. 1990), Ősz Erzsébet (PhD, 1999), Bokotey Sándor (PhD, 2001), Fehér Krisztina (PhD, 2003), Illyés Tünde-Zita (PhD, 2004)] e tudományterületet választották élethivatásuknak is.

A szerves vegyületek tömegspektrometriai (MS) vizsgálatával hazánkban az MTA KKKI-ben (Budapest) dr. Tamás József kandidátus (1932-1993) az 1970-es évek elején, elsőként kezdett el foglalkozni és a széles körű ismereteivel hamarosan a debreceni antibiotikum kutatásokat is segítette. A glikopeptid típusú antibiotikumok családjába tartozó risztocetin A (4) szerkezetének felderítése során savas hidrolízissel a redukáló di- (rutinóz, risztobióz) és triszaharid (risztotrióz, riszttrióz) mellett ugyanis egy új amino-dezoxi-hexóz származékot, az L-ristozamint (5) is izolálták [24], melynek a szerkezetigazolásánál és a szintézisének az NMR vizsgálatok mellett már az MS vizsgálatokra is támaszkodtak [25] (4. ábra).

Ezt követően Bognár professzor úr a Biogal (dr. Bálint János) és az Alkaloida (dr. Zsupán Kálmán) szakmai vezetőinek erkölcsi és anyagi támogatását is kihasználva az OMFB-nél kitartó munkával 1982-ben elérte, hogy a kémiai (CI) és deszorpciós kémiai (DCI) ionizációt is lehetővé tevő VG-7035 típusú GC-MS készülék a tanszékére kerüljön. Az MS laboratórium vezetője dr. Dinya Zoltán (1942-) az MTA Antibiotikum-kémiai Kutatócsoport műszeres analitikában (IR és UV) már jártas és a kvantumkémiai iránt is érdeklődő tudományos munkatársa lett, aki nagy lelkesedéssel látott munkához. Az új „szakma megtanulását” követően a támogató gyógyszergyárak (az embargó miatt ezek közvetlenül nem vásárolhattak ilyen berendezést!) igényeinek kielégítése és egyéb szolgáltatások mellett nemcsak a flavonoidok, a szénhidrátok és az antibiotikumok kémiájának a területéhez illeszkedő tömegspektrometriai kutatásokat kezdeményezett [26], hanem készséggel segítette az egyetem más kémiai intézeteiben folyó kutatásokat is. Az amerikai tanulmányútján (1983) pedig az Environmental Protection Agency (EPA) ohaoi laboratóriumában a vízminták GC-MS vizsgálatával ismerkedett meg. Hazatérve próbaméréseket végzett és kimutatta, hogy a debreceni ivóvizet jelentős mennyiségű toxikus, teratogén és karcinogén hatású szerves vegyület szennyezi. A Tiszamenti Regionális Vízműnél ugyanis a felszíni vizek csíráztalanítását nem az ún. ózonos technológiával, hanem az olcsóbb klórozással végezték. Bognár professzor úr a debreceni lakosság egészségét alapjaiban érintő vizsgálati eredményről értesülve, mint országgyűlési képviselő „bizalmas feljegyzés” formájában tájékoztatta a Hajdú-Bihar megyei Pártbizottság elnökét, az Országos Vízügyi Hivatal elnökhelyettesét és végül az OMFB-t is, és kitartó munkával 1985-ben végül elérte, hogy a debreceni lakosság vízellátását ózonos víztisztítással biztosítsák. Ezt követően a Környezetvédelmi Minisztérium megbízásra a debreceni MS laboratórium mérte fel a hazai folyóink közül a Duna, a Tisza és a Sajó szerves szennyezettségét, és e munkáról készített jelentéseknek is köszönhető, hogy a 80-as évek végétől a hatóságok is fokozódó figyelmet fordítottak a környezetünk tisztaságának megőrzésére. A laboratórium eredményei felkeltették a Honvédelmi Minisztérium (HM) érdeklődését is és megbízásuk alapján 1984-ben dr. Dinya Zoltán, Tóth Ákos (1942-) tanszéki elektromérnök és Komáromi Péter (1945-) műszerész segítségével az egyetem kémiai épülete mellett álló kamionban önálló energiaellátással és

kommunikációs rendszerrel felszerelt GC-MS laboratóriumot alakított ki, melybe az akkoriban talán a legmodernebbnek számító VG-12-250 típusú kvadrupol tömegspektrométert telepítették. Ez a mozgó laboratórium „beüzemelés” címén még egy éven át az egyetemen „állomásozott” és hatékonyan szolgálta a tanszéki kutatásokat. 1986-ban a laboratórium műszerparkja a nem illékony és hőre érzékeny molekulák vizsgálatát is lehetővé tevő a VG-70-70 HS típusú nagyfelbontású FAB (Fast Atom Bombardment) tömegspektrométer beszerzésével tovább bővült és számos új és érdekes tudományos eredmény született, közöttük az 1996-ban a megosztott Nobel-díjat (H. Kroto, R. Curl, R. Smalley) kiváltó „buckminsterfullerén”-nek (C₆₀) nevezett molekulával kapcsolatban is [27].

Az MS laboratórium ameleit, hogy hazánk elismert kutatóhelye lett, elsősorban dr. Dinya Zoltán docens lelkes munkája révén fontos oktatási centrummá is fejlődött. 1984-2005 között a vegyészek tömegspektrometriai oktatását végezte magas színvonalon és a laboratóriumából nemzetközileg elismert szakemberek (dr. Somogyi Árpád / University of Arizona, Tucson, USA; dr. Pócsfalvi Gabriella / University of Naples / Olaszország; dr. Jekő József / Alkaloida, Tiszavasvár; dr. Lipták András / Perform Hungaria Kft. Budapest; dr. Szabó Pál / MTA KKI, Budapest) kerültek ki.

2. Eredményeink a szerkezetvizsgáló módszerek alkalmazása területén

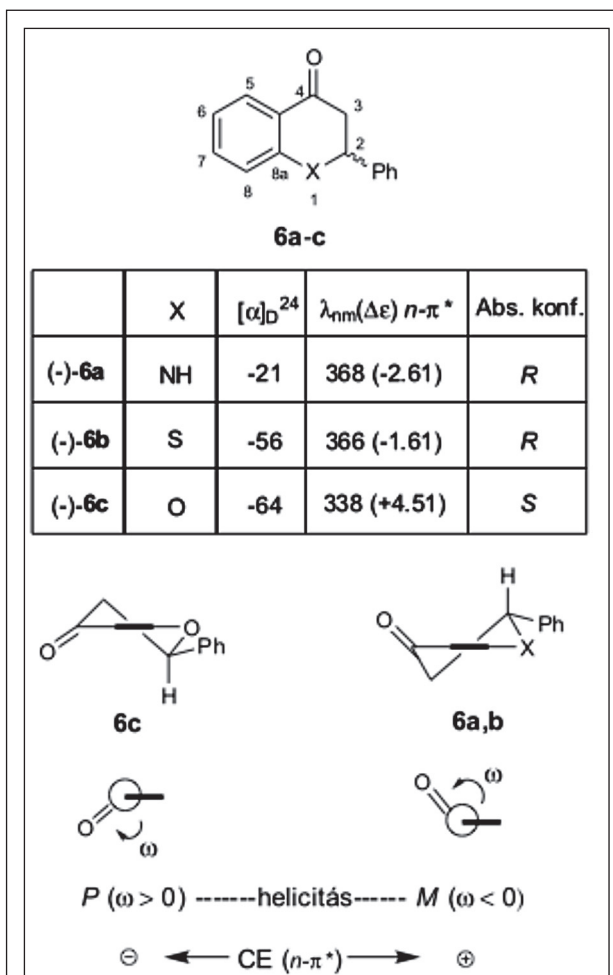
Kajtár Márton egyetemi tanár, a hazai kiroptikai kutatások úttörője – a magyar kutatók közül elsőként – az 1970-1972 évi Humboldt ösztöndíjas tanulmányútján dolgozott Snatzke professzor bonni laboratóriumában. Hazatérése után iskolateremtő munkásságával nagyszámú fiatal kutató érdeklődését – közöttük debreceniekét is – keltette fel e tudomány terület iránt, akik többnyire az NSZK ösztöndíjával (AvH, DFG, DAAD stb.), de estenként a magyar hatóságok előtt „bújtató módon” a német gyógyszeripar támogatásával végeztek eredményes kutatómunkát a Bochumi Egyetemen. 1991. június 21-én azonban szomorú hír rázta meg a magyar kémikus társadalmat. Santszke professzor magyarországi „helytartója”, Kajtár Márton egyetemi tanár életének 62. évében elhunyt. Halálával egy kiváló, közismert és köztiszteletnek örvendő tudóst, a hazai „kiroptikai spektroszkópia egének a legfényesebben ragyogó csillagát” veszítettük el (5. ábra). A kiroptikai kutatások helyzetét



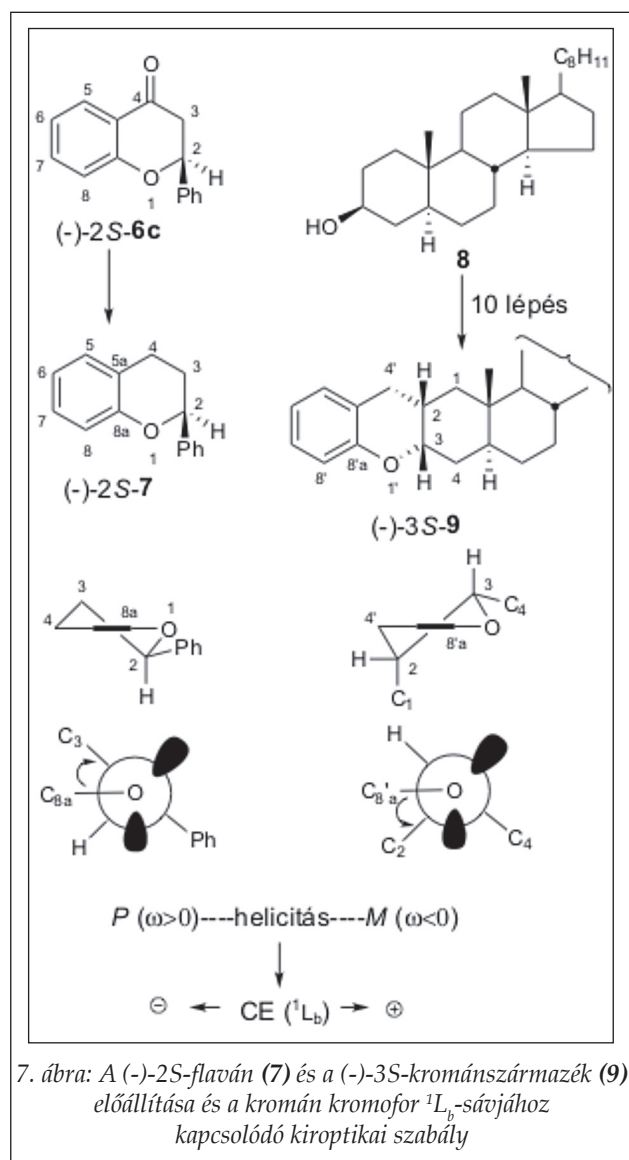
5. ábra: Kajtár Márton egyetemi tanár előadása Bulgáriában (1985)

tovább súlyosbította, hogy alig hat hónap múltán, 1992. január 14-én Snatzke professzor úrnak, az MTA tiszteletbeli tagjának (1986) és a Debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem (1982) díszdoktorának a szíve is utolsót dobant.

E szomorú események súlyosan érintették a Debrecenben folyó kiroptikai kutatásokat is, me-



6. ábra: (-)-Aza- (**6a**), (-)-tia- (**6b**) és a (-)-flavonon (**6c**) szerkezete és a CO csoport $n-\pi^*$ átmenethez tartozó kiroptikai szabály

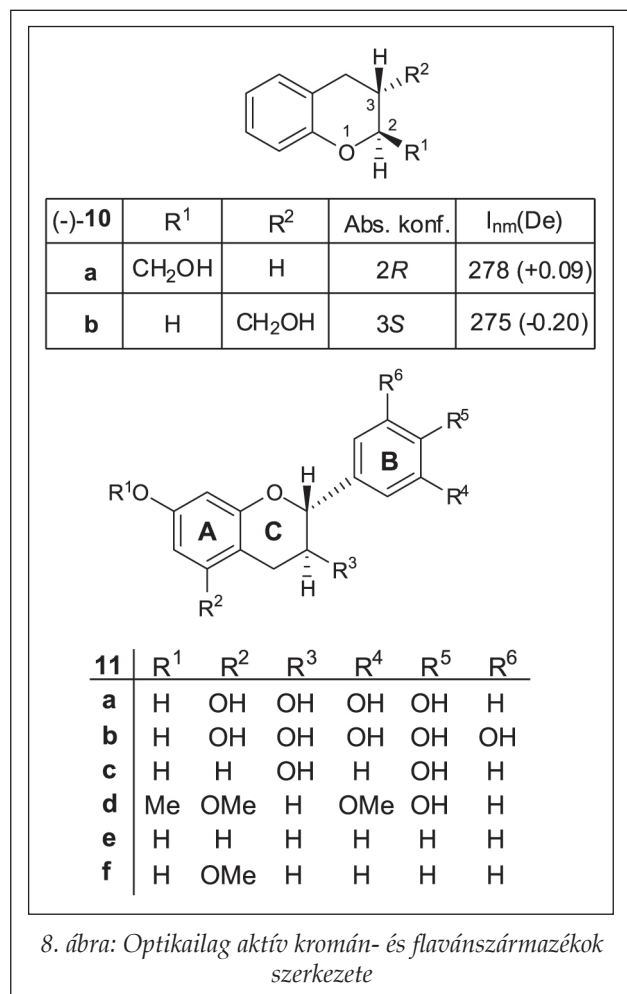


lyet a tanszékre kerülésemet követően Kajtár professzor tanítványának, Hollósi Miklós (1941-) egyetemi tanárnak és munkatársainak (dr. Kajtár Judit és dr. Majer Zsuzsa) baráti segítségével folytattunk tovább. Az együttműködésünk első „gyümölcse” 1994-re érett meg. A korábbi kutatásaink folytatásaként, a racém aza- és tiaflavanon (6a, b) rezolválásával kapott balraforgató enantiomerek abszolút konfigurációját a (-)-2S-flavanon (6c) kiroptikai adataira támaszkodva a Sznatzke szabály alapján (a királis acetofenon kromofor P/M helicitása estén a karbonil csoport $n \rightarrow \pi^*$ sávjához tartozó CE pozitív/negatív [28]) határoztuk meg [29] (6. ábra). A balraforgató flavanon [(-)-2S-6c] és a balraforgató aza-, valamint tiaanalógiának [(-)-2R-6a, b] heterokiralitása egyértelműen azt is igazolta, hogy a nátrium D-vonalán mért fajlagos optikai forgatás (OR) irányából a molekulák ab-

szolút konfigurációra tudományos igényességgel következtetni nem szabad.

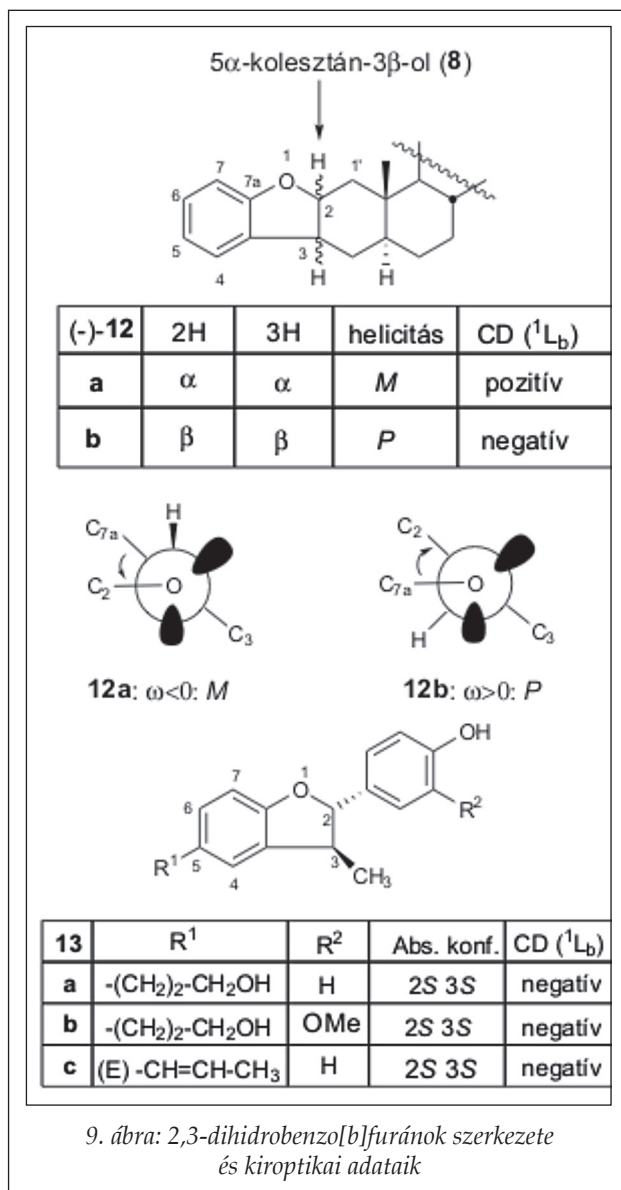
A kromán kromofor kiroptikai sajátosságainak vizsgálatához (-)-2S-flavanonból (6c), a kiralitás centrumát nem érintő redukcióval a (-)-2S-flavánt (7) is előállítottuk, melynek kromán kromofor rendszerét az *ekvatoriális* térálású C-2 fenilcsoport P helicitású félszék konformációban rögzítette. A heterogyűrű helicitását (P/M) a C-8a, O, C-2, C-3 kötések mentén fellépő torziószög (ω) előjele (P ha $\omega > 0$, és M ha $\omega < 0$) alapján definiáltuk. A tükörképi abszolút konformációjú kromán származékhoz [(-)-9] az 5 α -kolesztán-3 β -olból (8) kiindulva tízlépéses sztereospecifikus szintézissel jutottunk. E vegyület heterogyűrűjének a Dreiding modellje alapján feltételezett M helicitású félszék konformációját az 1H -NMR vizsgálatok egyértelműen igazolták. Az így nyert merev térszerkezetű krománszármazékok különböző polaritású oldószerekben mért CD színképei érdekes módon azonban azt mutatták, hogy a kromán kromofor (királis második szférájú benzol kromofor) (1L_b)-sávjához tartozó Cotton-effektus (CE) előjele és a heterogyűrű helicitása közötti összefüggés Sznatzke és Ho által a tetralin és tetrahydroizokinolin kromoforra megadottal (pozitív/negatív, ha P/M) ellentétes [30a] (7. ábra). Ezt a (-)-2S-flavanon (6c) CD színképe is igazolta. E vegyületben – mint azt a 6. ábra is szemlélteti – a P helicitású acetofenon kromofort magában foglaló heterogyűrű helicitása M és ennek megfelelően a 310 nm-nél jelentkező (1L_b) CE negatív. A helicitási szabályunkat Sznatzke és Kajtár által közöltek szerint [30b], a benzolgyűrű szubsztituenseinek a Platt- és Petruska-féle spektroszkópiai momentumaiból (\bar{q}_i) [31] számított, a gerjesztés során keletkező indukált dipólus momentum ($\Sigma \bar{q}_i = \bar{\mu}_i$) irányváltozával is értelmeztük. Minthogy e téma kijelölésében Sznatzke professzornak meghatározó szerepe volt és e munkánk a korábbi sikeres együttműködésünkre támaszkodott [7b, 32], ezért a fenti eredményeket utolsó „kézfogásként” a nevének feltüntetésével közöltük [29].

A kromán kromofor kiroptikai viselkedésével kapcsolatban később azt is kimutattuk, hogy a diagnosztikus α -sávhoz tartozó CE előjelét – ellentétben Sznatzke és mtsai által az optikailag aktív tetralin és tetrahydroizokinolin származékok körében megfigyelttel [30] – az aromás gyűrűhöz C-5, C-7 helyzetben kapcsolódó nagy spektroszkópiai momentumú akirális szubsztituensek (pl. hidroxi-, vagy metoxicsoport) sem változtatták meg [33]. Így a kiroptikai szabályunkat biztonsággal használhattuk nemcsak az enzimkatalizált ki-

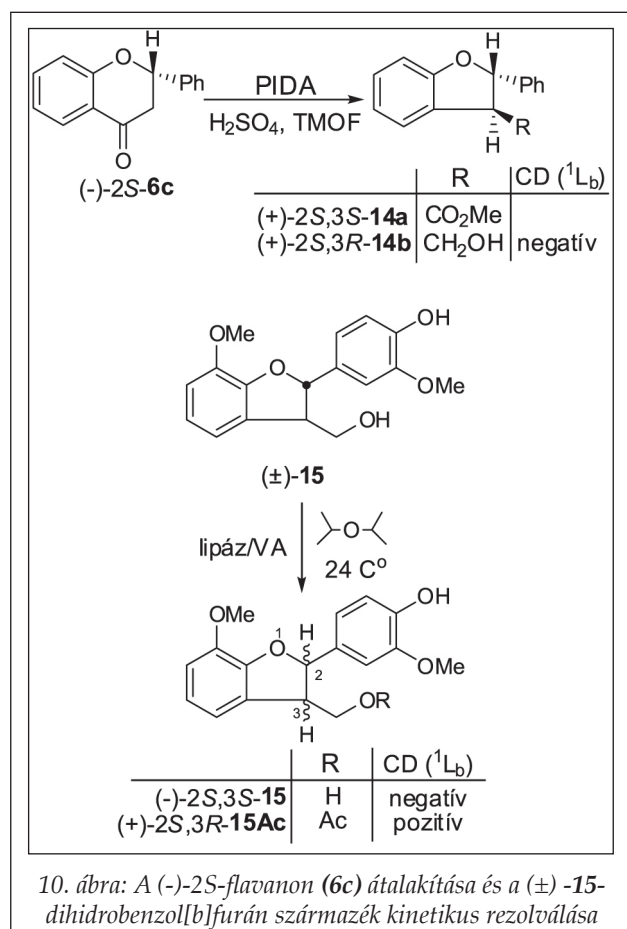


netikus rezolválásával nyert optikailag aktív 2- és 3-hidroximetil-krománok (**10a, b**) [34], hanem a **11a-f** természetes eredetű biológiailag aktív A-gyűrűben szubsztituált flavánszármazékok abszolút konfigurációjának a meghatározására is [35] (8. ábra).

A természetben a 4*H*-benzopirán (kromán) vázas vegyületek mellett a 2,3-dihidrobenzo[*b*]furánt tartalmazóak is előfordulnak és számos képviselőjük értékes biológiai hatását is megfigyelték. Kézenfekvő volt ezért, hogy e kromofor rendszer kiroptikai sajátságait is behatóan tanulmányozzuk. A CD vizsgálatainkhoz a korábbi munkánk alapján az ismert és merev térszerkezetű (*P* és *M* helicitású) modell vegyületeket (**12a, b**) az 5α-kolesztán-3β-ol-ból (**8**) sztereokontrollált szintézissel állítottuk elő. Ezek oldószerfüggő CD vizsgálata egyértelműen azt mutatta, hogy a szubsztituátlan 2,3-dihidrobenzo[*b*]furán és a kromán kromofor a kiroptikai sajátságaik azonosak, azaz a heterogyűrű C-7a, O, C-2, C-3 kötése által alkotott torziószög előjele alapján definiált helicitását (*P/M*) az α (¹L_b) – sávnál *negatív/pozitív*



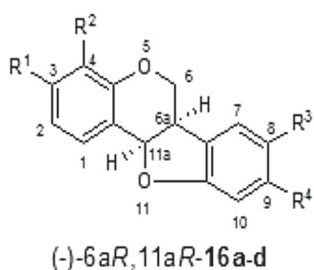
CE jelzi [36] (9. ábra). E szabályt alkalmazva a *Krameria cystioides* biológiailag aktív norneolignán komponenseinek (**13a-c**) Achenbach és mtsai által közölt [37] abszolút konfigurációját helyesbítettük, Simonyi Miklós (1935-) egyetemi magántanárral (MTA KKI) együttműködve pedig a (-)-2*S*-flavanon (**6c**) sztereospacifikus gyűrűszűkülési reakciójának [(+)-2*S*-**6c** → (+)-2*S*,3*S*-**14a**] mechanizmusát derítettük fel [38a]. A *racém* **15** 2,3-dihidrobenzo[*b*]furán származék enzim katalizált kinetikus rezolválásakor kapott enantiomerek [(-)-**15**, (+)-**15Ac**] abszolút konfigurációját is e szabály alapján határoztuk meg. Ezek CD adatainak a (+)-2*S*,3*R*-**14b** 2,3-dihidrobenzo[*b*]furán származékéval való összehasonlítása pedig egyértelműen azt is megmutatta, hogy a szubsztitúció függőségét illetően a 2,3-dihidrobenzo[*b*]furán kromofor



„tűrképessége” a krománénál kisebb. A C-7 helyzetű nagy spektroszkópai momentumú metoxisoport ($\bar{q}_i = +21$) ugyanis a diagnosztikus (1L_b) CE előjelét – jó egyezésben az indukált dipolus momentum ($\bar{\mu}_i$) becsült irányváltozásával – megváltoztotta [38b] (10. ábra). Ennek figyelembevételével nagyszámú természetes eredetű 2,3-dihidrobenzo[b]furán származék irodalomban közölt abszolút konfigurációját helyesbítettük [35b].

A természetben előforduló pterokarpánoknak figyelemre méltó HIV-1, gomba-, kígyó- és pókméreg ellenes hatásuk van [39]. E vegyületek alapvázában a kromán és a 2,3-dihidrobenzo[b]furán gyűrűrendszer *cisz* gyűrűannulációval kapcsolódik össze. Az abszolút konfigurációjuk (6aR,11aR vagy 6aS,11aS) kiroptikai spektroszkópiával történő egyértelmű meghatározásához ismernünk kellett, hogy a kiroptikai viselkedésüket e kromoforok ún. exciton típusú kölcsönhatása, vagy csak az egyikük domináns jellege miként határozza meg. E vizsgálatainkat a szintetikusan *racemát*-ként könnyen hozzáférhető **16a-d** pterokarpánok rezolválásakor tett korábbi megfigyelésünk jelentősen megkönnyítette [40]. E vegyületek enantiomerjeit ugyanis a Chiralpack OT (+) (Daicel Co.)

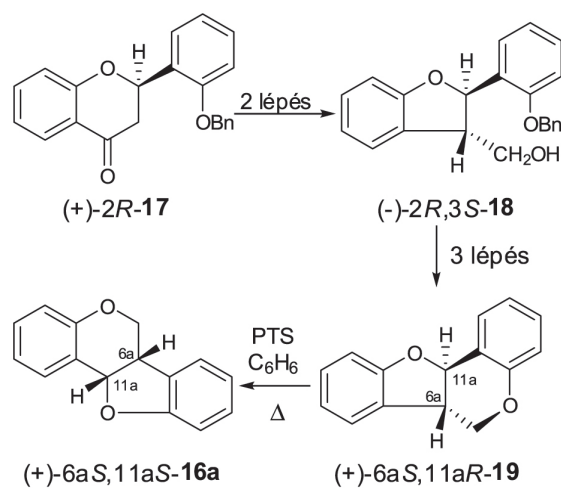
optikailag aktív királis állófázisú HPLC oszlopon alapvonalon ($R_s > 2$) sikerült elválasztani. Kézenfekvő volt ezért, hogy ezt az UV-detektálás mellett, az ún. stopped-flow technikát alkalmazva CD-vel is kövessük és az így kapott online CD spektrumok alapján a kiroptikai sajátságai és a térszerkezetük közötti összefüggést közvetlenül tanulmányozzuk. A két analitikai rendszer (HPLC-CD) „házilagos” illesztését Hollósi professzor és munkatársai sikeresen oldották meg és így valóban könnyen jutottunk a **16a-d** pterokarpán-származékok jobbra- és balraforgató enantiomerjeinek a tükörképi CD színeképeihez. Az izokratikus körülmények között a balraforgató enantiomerek eluálódtak hosszabb retenciós idővel és a CD színeképükben – a röntgen adatok alapján a már ismert balraforgató 6aR,11aR-konfigurációjú maackiinnal (**16d**) megegyezően – az 1L_b -sáv tartományban jelentkező két CE közül a hosszabb hullámhosznál lévő pozitív volt. Megjegyzendő, hogy a 1B_b -sávnál pedig kivétel nélkül negatív CE-t kaptunk (11. ábra). E Cotton-effektusok relatív intenzitása és rotátorerőssége (CE alatti terület nagysága) azt mutatta, hogy a kiroptikai sajátságuk nem a kromoforok közötti ún. exciton típusú kölcsönhatára, hanem közel azonos mértékű additív hozzájárulásukra vezethető vissza. Ez alapján a (1L_b)-sáv tartományában a hosszabb hullámhosznál jelentkező CE előjelét illetően, a 6aR,11aR / 6aS, 11aS à (1L_b) CE pozitív/negatív összefüggést valószínűsítettük [41]. Erre következettünk e kromofor rendszerekre fentebb már ismertetett helicitási szabályok alkalmazásával is. Az $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatok és kvantumkémiailag számítások szerint a 6aR, 11aR-pterokarpán [(–)-**16a**] kromángyűrűjének félszék konformációja ugyanis *P* helicitású és a C-11a szénatomjához az *M* helicitású 2,3-dihidrobenzo[b]furán gyűrűrendszer oxigénatomja *pseudoaxiális* állásban kapcsolódik. A 12. ábrán bemutatott összegzés alapján, ezért a kromán kromofor az (1L_b)-sávnál pozitív CE vártunk. A 2,3-dihidrobenzo[b]furán kromofor hozzájárulása a kiroptikai szabályunk alapján a heterogyűrű *M*-helicitása (királis 2. szféra) és a benzilhelyezetű szén – szén kötés (C6a-C6) *pseudoaxiális* térállása (királis 3. szféra) miatt pedig negatív (1L_b) CE-vel tükröződik (12. ábra). A (–)-**16a** esetében kísérletileg valóban ezt tapasztaltuk. A (–)-**16b-d** származékok online CD színeképei pedig azt igazolták, hogy a várakozásunknak megfelelően a nagy spektroszkópai momentumú szubsztituensek csak a 2,3-dihidrobenzo[b]furán kromofor (1L_b)-sávjához tartozó CE előjelét változtat-



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	CD: λ nm($\Delta\epsilon$)		
					1L_b	1B_b	
a	H	H	H	H	287(+4.8)	269(-1.1)	229(-5.9)
b	OH	H	H	OMe	287(+5.3)	-	236(-13.2)
c	OMe	H	H	OMe	287(+5.4)	-	236(-11.3)
d	OH	H	-OCH ₂ O-		308(+0.8)	290(+0.9)	237(-2.9)

11. ábra: (-)-6aR, 11aR-pterokarpánok szerkezete és kiroptikai adataik

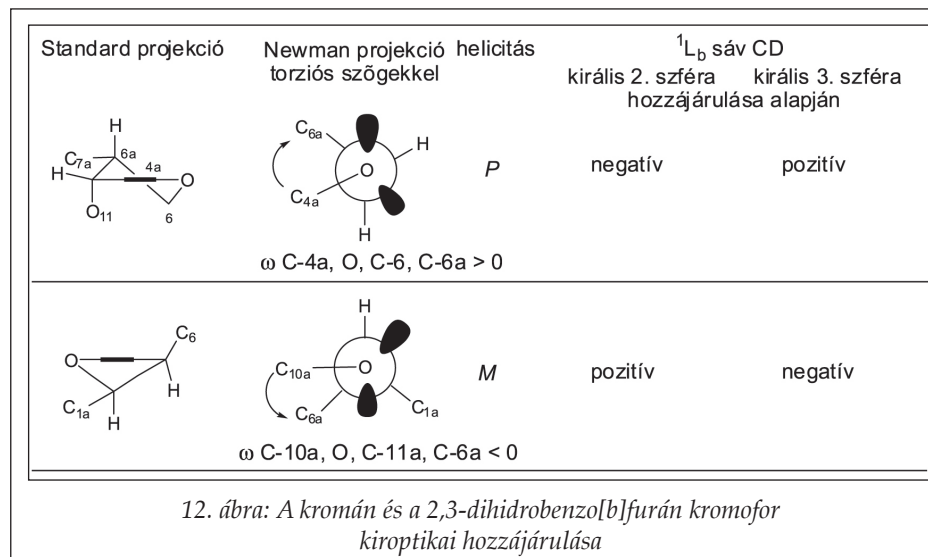
ták meg. A (-)-**16b** és -**c** CD színekében e diagnosztikus (1L_b) CE-k ezért egymással átfedve – szükségszerűen – nagyobb intenzitással, a (-)-**16d** származéknál pedig elkülönülten, és így kisebb intenzitással jelentek meg [41]. A (+)-R-2'-benziloxiflavanonból [(+)-**17**] a (+)-**18** 2S,3S-dihidrobenezol[b]furán származékon keresztül – a (-)-6aS,11aR-pterokarpánt (**19**) is előállítottuk, melynek a CD színeké a fenti összefüggés helyességét egyértelműen igazolta (13. ábra). E vegyületben az M helicitású B/C gyűrűk *transz* anellációja miatt a 6a és 11a helyzetű protonok *diaxiális* állásúak és, így ellentétben a *cisz*-pterokarpánokkal (**16a-d**) a benzil helyzetben nincs



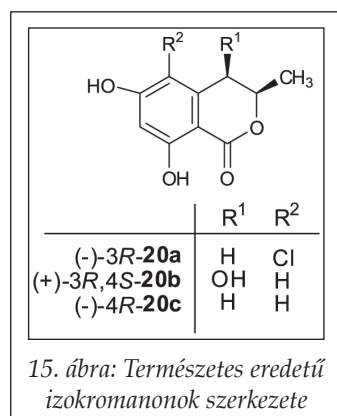
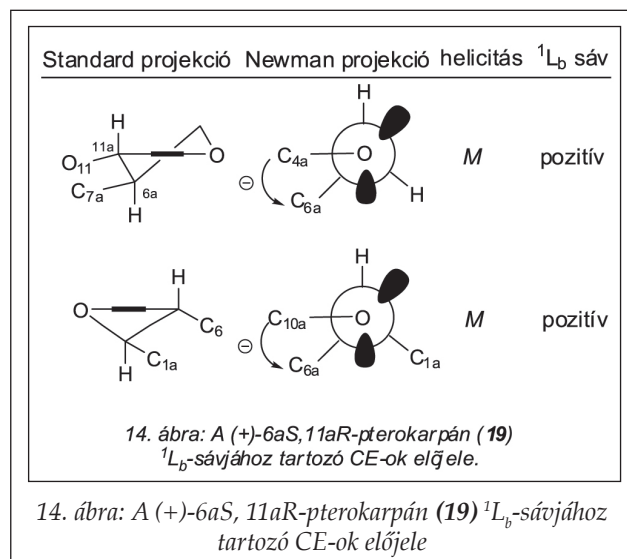
13. ábra: A (+)-6aS, 11aR- és a (+)-6aS, 11aS-pterokarpán szintézise

axiális térállású szubsztituens. Ennek hiányában azonban mindkét kromofor (1L_b)-sávjánál a CE pozitív ($\lambda = 248$ nm, $\Delta\epsilon = +0.79$ és $\lambda = 278$ nm, $\Delta\epsilon = +0.82$) volt (14. ábra). E vegyületből sav katalizált epimerizációjával (C-11aR à C-11aS) a jobbraforgató pterokarpánt [(+)-6aS,11aS-16a] kaptuk meg, melynek a CD színeké – a kiroptikai szabályunk helyességét igazolva – teljes egyezést mutatott a *racém* pterokarpán [(±)-**16a**] királis HPLC-vel végzett rezolválásakor kapott jobbraforgató enantiomerével [42].

E kutatásaink kapcsán eredményes nemzetközi együttműködések bontakoztak ki. K. Krohn professzorral (1944-, University of Paderborn) a kapcsolatot az antibakteriális hatású természetes eredetű izokromanonok (**20a-c**) abszolút konfigurációjának a meghatározása kapcsán vettük fel. Ezt Snatzke professzorral e területen végzett kutatásaink eredményeire támaszkodva [32a] oldottuk meg [43] (15. ábra). Az antifungális hatású természetes eredetű biszpiro-naftilidén vázas O-heterociklusok (**21a-c**; prajszomerin-J, -K és -L) abszolút konfigurációjának meghatározásánál is a **6a-c** flavanonok kiroptikai vizsgálatait kapcsán is említett Snatzke szabályt [28] használtuk. A prajszomerin-L (**21c**) esetében a javaslatunkat (3R, 3'R, 4S, 4S) szemiepi-



tatásai eredményeire támaszkodva [32a] oldottuk meg [43] (15. ábra). Az antifungális hatású természetes eredetű biszpiro-naftilidén vázas O-heterociklusok (**21a-c**; prajszomerin-J, -K és -L) abszolút konfigurációjának meghatározásánál is a **6a-c** flavanonok kiroptikai vizsgálatait kapcsán is említett Snatzke szabályt [28] használtuk. A prajszomerin-L (**21c**) esetében a javaslatunkat (3R, 3'R, 4S, 4S) szemiepi-

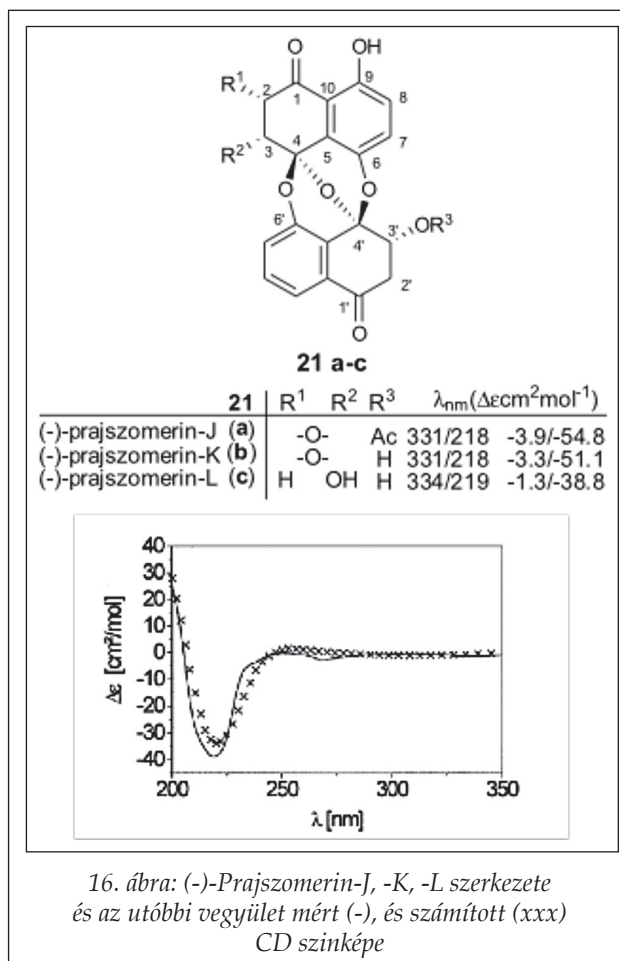


csak el az egykristályban rögzítettől. A röntgen koordináták alapján a BDZDO/MCDSPD programmal, ezért a 3R, 3'R, 4S, 4S konfigurációjú enantiomer ECD színeképét számítottuk ki, melynek a mérttel mutatott jó egyezése a Snatzke szabály alapján tett javaslatunkat egyértelműen igazolta [44] (16. ábra).

H. Hostettmann professzorral (1941-, University of Lausanne) folytatott együttműködésünk a természetes eredetű biológiailag aktív (-)-2R- 11e-f flavánok, a (-)-2R,3R-22a-c 3-hidroxiflavanon glikozidok, a (-)-2S- 23a, b O-prenilflavanonok, a (-)-6S-2'R-24a és a (-)-6R-4'R,6'R-24b alkil α -piro-nok, valamint a (-)-3R-25 izoflavanonszármazék (vogelin-D) abszolút konfigurációjának a meghatározása során bontakozott ki [35a, 45] (17. ábra).

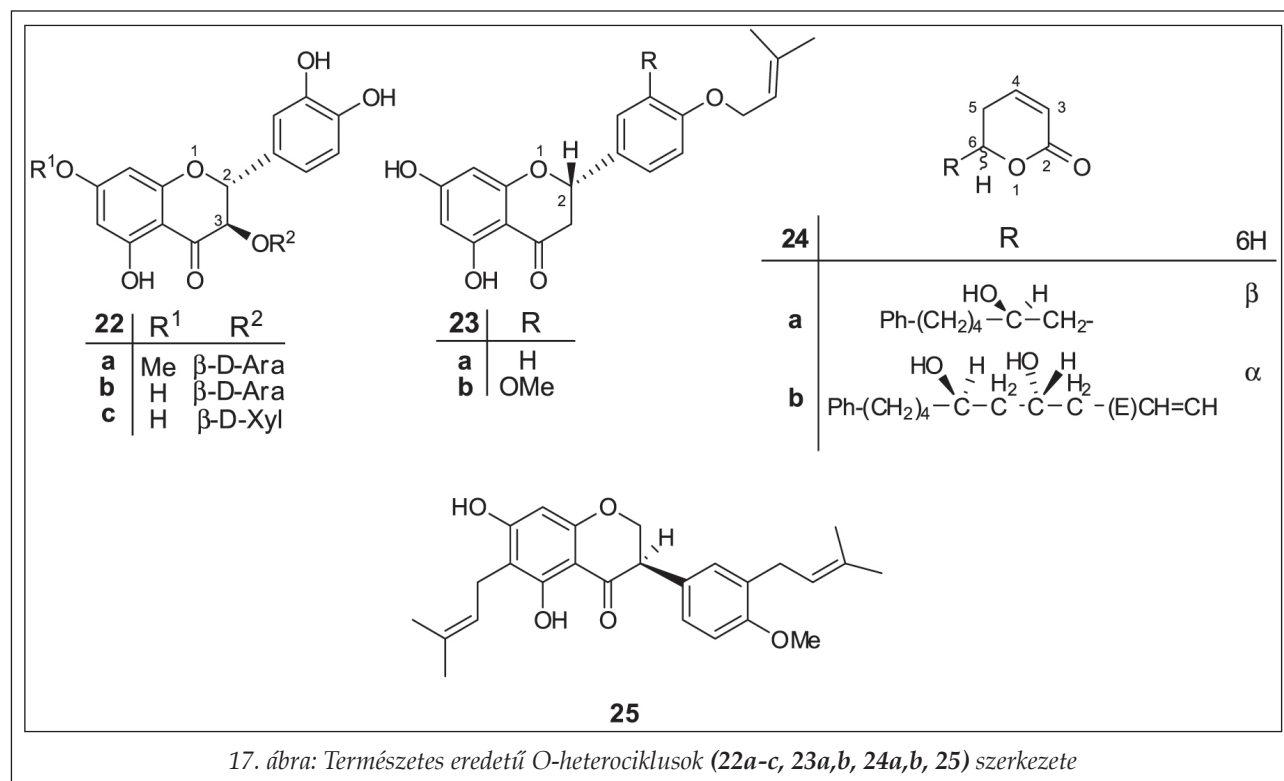
Jóllehet Hollósi és Simonyi professzorok, valamint munkatársaik a fenti vizsgálatok során mindig készséggel álltak a rendelkezésünkre, de a kutatásaink szélesítése és e szerkezetfelderítő módszer a debreceni vegyész és gyógyszerész M.Sc és PhD hallgatók az oktatásába történő bevezetése érdekében Snatzke professzor halálát (1992) köve-

rikus kvantumkémai számításokkal is meg erősítettük. Erre az adott lehetőséget, hogy e vegyület röntgen adatai szerint a Spartan programmal számolt energetikailag legkedvezőbb konformációja (oldat-ban is feltehetően ez a konformer van túlsúlyban!) alig tért



tően nagy erőfeszítéseket tettünk, hogy a kirop-tikai vizsgálatok infrastrukturális háttérét mielőbb a tanszékünkön is megteremtjük. E tervünket az OTKA, az OMFB, Alapítvány a Magyar Felsőoktatásért és Kutatásért, valamint a Richter Gedeon Nyrt. hathatós támogatásával, valamint az ABL&E-JASCO Magyarország Kft. (Szepesi Ildikó kereskedelmi igazgató) tudomány pártolásával fokozatosan valósítottuk meg.

1998-2002 között a két diadassoros Jasaco HPLC-hez illesztett Jasco J-810/150-S típusú spektropolariméter rendszert építettük ki, melyhez termosztálható (20-85°C) küvetta és optikai forgatóképeségi detektor (Jasco-2090 Plus) is tartozik. 2007 óta a Richter Gedeon Nyrt. a kutató munkánk támogatására, költségtérítés nélkül „állandó” használatra a Jasco J-715 típusú OR/ORD készülékét telepítette a tanszékre, melynek a HPLC-hez való illesztését is megoldottuk. 2009-ben pedig 3 nagyteljesítményű computer (Intel Core i7-950) és a megfelelő szoftverek beszerzése a CD színeképek kvantumkémai számításának lehetőségét teremtette meg. E számításokat már Mándi Attila PhD hallgató végzi, aki felkészültségét dr.

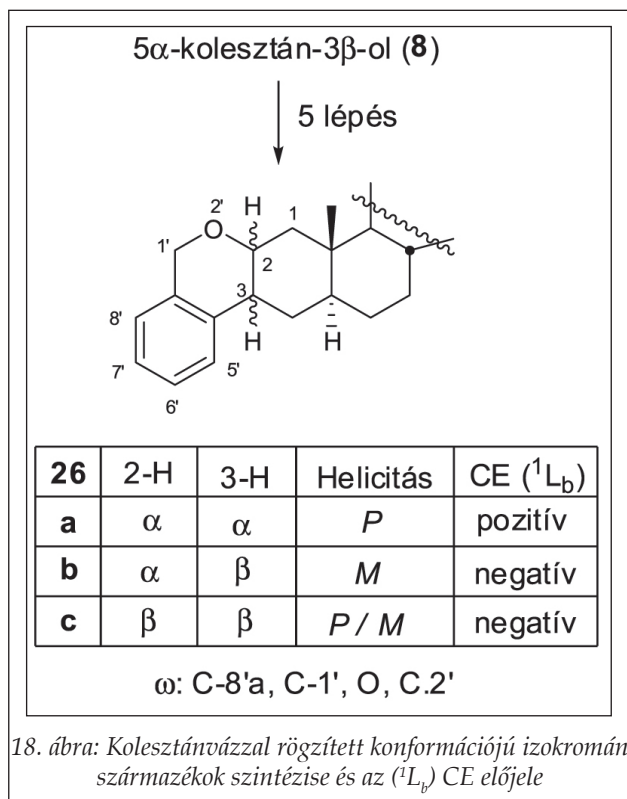


17. ábra: Természetes eredetű O-heterociklusok (22a-c, 23a,b, 24a,b, 25) szerkezete

Komáromi István tudományos főmunkatárs (DE OEC Klinikai Kutató Központ), dr. G. Pescitelli (University of Pisa) és dr. B. Elsässer [szül. Várkonyi Brigitta, MSc (Debrecen 2000); PhD (2004, University of Paderborn)] segítségével szerezte meg.

A tanszékünkön így egy jól felszerelt, széles hazai és nemzetközi kapcsolatokkal is rendelkező CD laboratóriumunk van, melynek vezetője dr. Kurtán Tibor (1973-) okl. vegyész és angol szakfordító. A diplomáját 1996-ban az egyetemünkön (korábban KLTE) szerezte és a PhD értekezésének (2001) a témája a kromán és 2,3 dihidrobenzo[b] furán vázas vegyületek sztereoselektív szintéziséhez és kiroptikai sajátságai vizsgálatához kapcsolódott. Ez utóbbi vegyületek vizsgálata kapcsán a Fullbright Alapítvány támogatásával másfél évet (1999-2001) dolgozott az USA egyik vezető egyetemén (Columbia University of New York) a kiroptikai kutatások kiemelkedő művelője K. Nakanishi professzor (1929-) és N. Berova professzor asszony (1941-, Snatzke professzor munkatársa volt Bochumban 1992-ig) laboratóriumában. Irányításukkal nemcsak nagy jártasságot szerzett a kiroptikai spektroszkópia elméletében és gyakorlati alkalmazásában, hanem az optikailag aktív szekunder alkoholok és primer aminok abszolút konfigurációjának meghatározására alkalmas ún. cink porfirirines, exciton kölcsönhatáson alapuló, nagy nemzetközi érdeklődést is kiváltó új mód-

szert dolgozta ki [46]. Hazatérését követően a PhD értekezését sikerrel védte meg, és a tanszéken egyetemi tanársegédi állást kapott (2001), 2006-ban pedig adjunktussá nevezték ki. Sikeres munkáját tanúsítja, hogy a PhD értekezésének megvédése óta 45 közleménye jelent meg a szakterület legrangosabb nemzetközi folyóirataiban, 2009-ben pedig az „Abszolút konfiguráció meghatározása oldatban és szilárd fázisban” című értekezése alapján egyetemünkön habilitált. Kiváló elméleti felkészültségének és jó kapcsolatteremtő készségének is köszönhető, hogy a nemzetközi együttműködések (prof. N. Berova / New York, prof. K. Hostettmann / Lausanne, dr. K. Krohn / Paderborn és prof. K. Nakanishi / New York) jelentősen szélesedtek (prof. P. Salvadori és dr. G. Pescitelli / Pisa, prof. Y. Ye, prof. W. Zhang és prof. Y-W. Guo / Shanghai) és a laboratóriumunkban nemcsak a doktori hallgatóink, hanem a Debreceni Egyetem más tanszékeinek munkatársai (dr. Ősz K., dr. Király R. és dr. Csapó É.) és külföldi vendégkutatók is (prof. K-Kahanbabaee, dr. K. Steingröver, S. Müller és B.Torun / Paderborn, dr. Naghmana Rashid / Pakisztán) dolgoztak. A tanszékünkön folyó kiroptikai kutatások területe így az azido-, a diszulfid-, a naftalin- kromofort tartalmazó szénhidrátok, Cu(II)-ionnal képzett peptid komplexek, quanozint tartalmazó szupramolekuláris polimerek és a humán transzamináz enzim Ca(II)-kötőhelyének

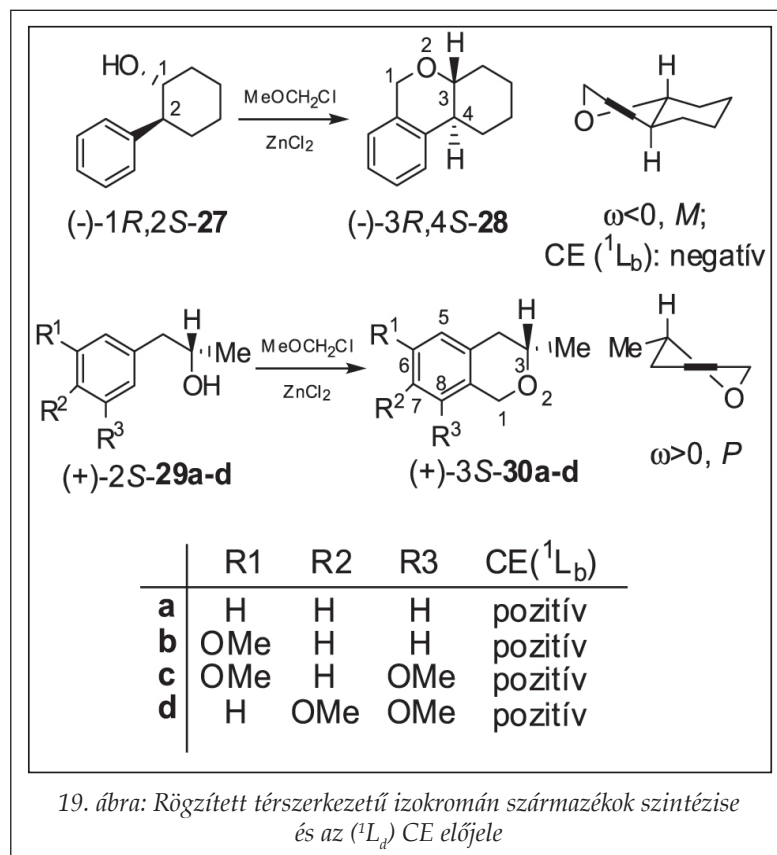


vizsgálatával is jelentősen szélesedett [47]. Az érdeklődésünk középpontjában azonban változatlanul a természetes eredetű biológiailag aktív O-heterociklusok, közöttük is a benzol kromofor tartalmazó vegyületek vizsgálata maradt.

A biológiailag is aktív természetes eredetű 3-szubsztituált izokromán és izokromanon (2,3-dihidroizokumarin) származékok kromofor rendszerének tanulmányozását *Snatzke* professzorral kezdtük meg [32a]. Az 5 α -kolesztán-3 β -ol-ból (8) sztereospecifikus szintézissel kapott rögzített térszerkezetű izokromán származékok (26a-c) CD vizsgálata során ugyanis azt találtuk, hogy a 26a,b izokrománszármazékok, *Snatzke* és *Ho* által tanulmányozott teralin kromoforral [30a] megegyező módon viselkedtek (az izokromán gyűrű *P/M* helicitása pozitív/negatív (1L_b) CD-vel járt). A 2H- β , 3H- β konfigurációjú izomer (26c) acetonitrilben szobahőmérsékleten felvett CD spektrumában azonban az (1L_b) CE nem pozitív, hanem negatív volt, jöllehet a molekula Dreiding modellje alapján a heterogyűrű a konformációját *P* helicitásúnak valószínűsítettük (18. ábra). Ezen ellentmondás magyarázataként feltételeztük, hogy e molekula konformációja a poláros oldószerben a megváltozott és a termodinamikailag kedvezőtlen *axiális* helyetű C-3 arilcsoport, az energetikailag kedvezőbb *ekvatoriális* állás felé mozdult el és így az *M* helicitású kád konformer került túlsúlyba. Az

$^1\text{H-NMR}$ vizsgálataink ezt azonban nem igazolták, és így a kérdés megnyugtató tisztázása érdekében további vizsgálatokat végeztünk.

A kereskedelembe is hozzáférhető (–)-1*R*,2*S*-2-fenilciklohexánból [(–)-27] a kiralitás centrumok konfigurációját nem érintő gyűrűzárással a (–)-3*R*,4*S*-28 izokromán származékot állítottuk elő, melynek a CD színeképében az (1L_b)-sávhoz negatív CE tartozott. Minhogya e molekula Dreiding modellje és az $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatok egybehangzóan a heterogyűrű *M* helicitását igazolták, így ez a fentebb említett helicitási szabályunk érvényességére utalt (19. ábra). További bizonyítékul szolgált az $^1\text{H-NMR}$ vizsgálatok szerint *P* helicitású (+)-3(*S*)-metilizokromán (30a) (1L_b)-sávjánál mért pozitív CE is. E vegyületet a 19. ábrán feltüntetett módon a *racém* 3-fenilpropán-2-ol (29a) enzim katalizált kinetikus rezolválásával nyert balrafordító alkohol [(–)-*S*-29a] gyűrűzárásával kaptuk meg, melynek a (2*S*) abszolút konfigurációját az enzim aktív centrumának irodalomból jól ismert *S* szelektivitása mellett a már említett zink pofirines exciton kölcsönhatáson alapuló CD módszerrel [46] is igazoltuk. A nagy spektroszkópiai momentumú ($\bar{q}_i = +21$) metoxycsoporttal (tokkal) szubsztituált származékokat [(+)-30b-c] is ezen az úton előállítottuk elő. Ezek kiroptikai vizsgálata pedig arról tanúskodott, hogy ellentétben a királis tetralin kromofor esetében tapasztalttal [30], az izokromán kromofor kiroptikai sajátosságait az aromás gyűrű szubsztituensei nem befolyásolták, azaz a heterogyűrű *P/M* helicitásához vátoztalanul pozitív/negatív (1L_b) CD tartozott [48]. Ennek ismeretében a kiroptikai szabályunkat már biztonssággal használhattuk a természetes eredetű biológiailag aktív 3-alkilizokrománok széles körében. Például a *Pseudoanguillospora* sp. endofita gombából izolált antifungális hatású pszeudoanguillosporin A [(–)-3*R*-31a] és B [(–)-3*R*, 6'*R*-31b] (3*R*) abszolút konfigurációját az (1L_b)-sávhoz tartozó negatív CE alapján adtuk meg. A hozzárendelésünk helyességét az oldatban mért és az *ab initio* TDDFT (Time Dependent Density Functional Theory) kvantum-mechanikai módszerrel számított CD színeképének összehasonlítása is igazolta. A számításaink egyszerűsítése érdekében e vegyületek n-heptil oldalláncát metil csoporttal helyettesítettük és a CD színeképet MMFF és DFT [B3LYP/6-G(d)] programokkal optimalizált geometriájú (*R*)-3,5-dimetil-6,8-dihidroxiizokrománra számítottuk ki. A pszeudoanguillosporin B [(–)-3*R*, 6'*R*-31b] n-heptil oldalláncában lévő kiralitáscentrum (C-6') abszolút konfigurációját pedig, a

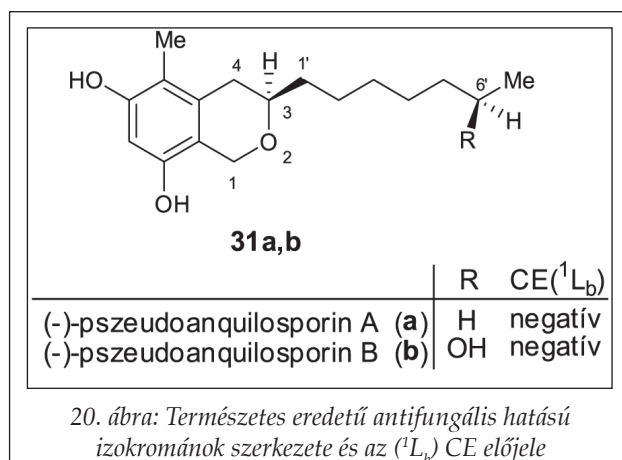


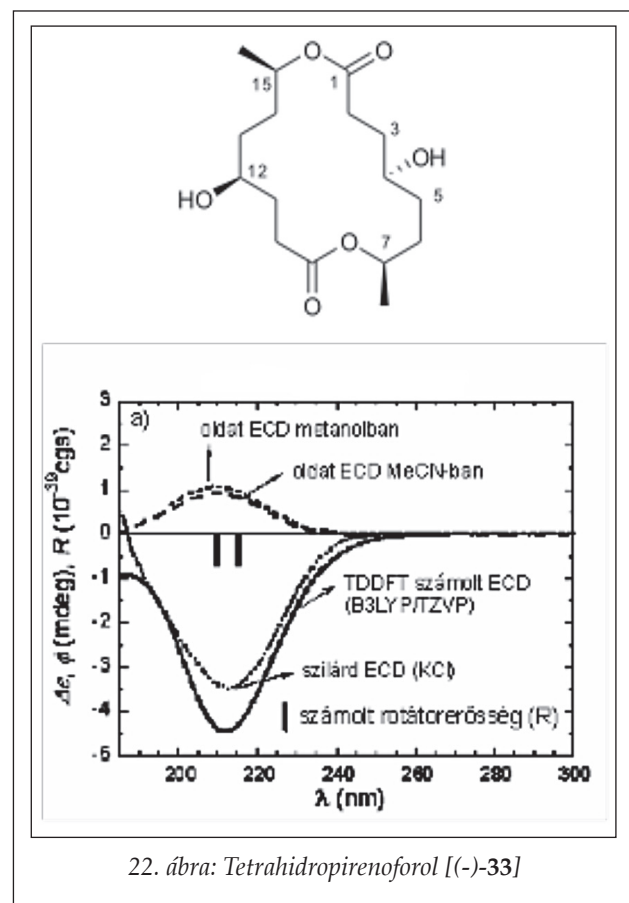
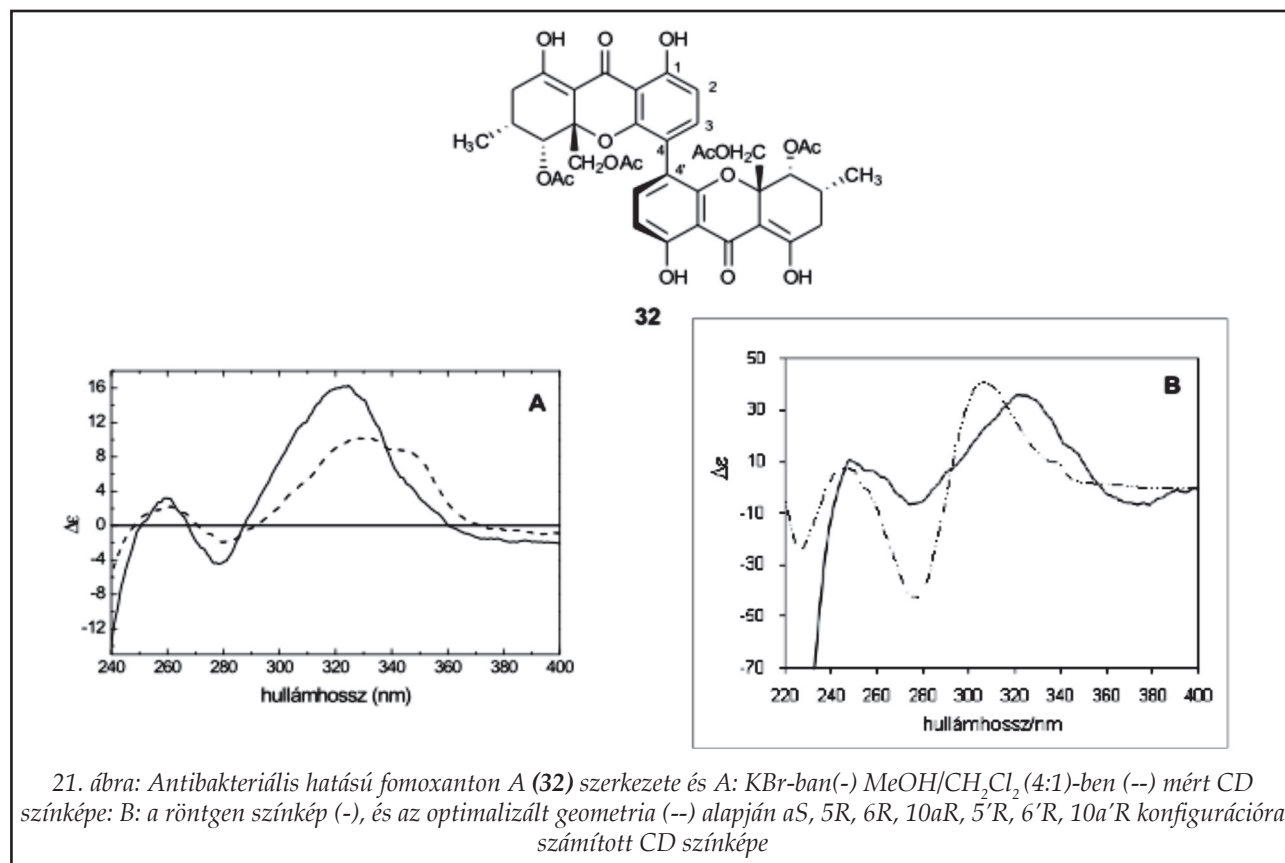
Mosher-féle NMR módszerrel határoztuk meg [49] (20. ábra).

Az oldatban mért ECD spektrumok kvantumkémiai számításán alapuló konfiguráció meghatározás kritikus lépése az egyensúlyban lévő konformerek Boltzmann eloszlásának pontos megadása. Minthogy az egyes konformerek a karakterisztikus CD átmeneteknél gyakran ellentétes CE-t adnak, így az előjelük és az arányuk pontos ismerete nélkül az eredő ECD spektrum biztonsággal nem számítható ki. A konformatív mozgékonyabb molekulák esetében ezért ez a módszer már nem használható.

E probléma megoldása érdekében megkíséreltük a CD színeképet makroszkópikus anizotrópiától [lineáris dikroizmus (LD), cirkuláris kettőstörés (LB) stb.] és szupramolekuláris kölcsönhatásoktól mentes módon szilárd fázisban (KCl vagy KBr pasztillában) felvenni. A molekulák a kristályosodásuk során a kristályrácsban többnyire egyetlen konformációban rögzülnek. E konformer röntgendiffrakciós koordinátáit használva a CD színeképe TDDFT módszerrel számítható és ennek a szilárd fázisban mérttel való összehasonlítása az abszolút konfiguráció meghatározására ad lehetőséget. Dr. Kurtán Tibor adjunktus gondos és kitartó munkával kidolgozta a KBr-os vagy a KCl-os

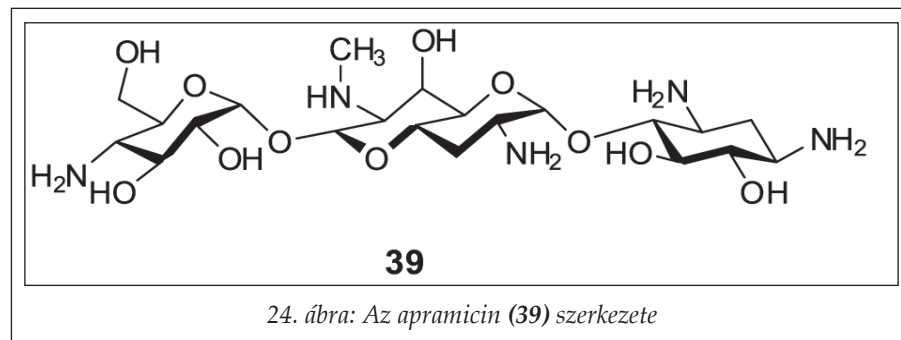
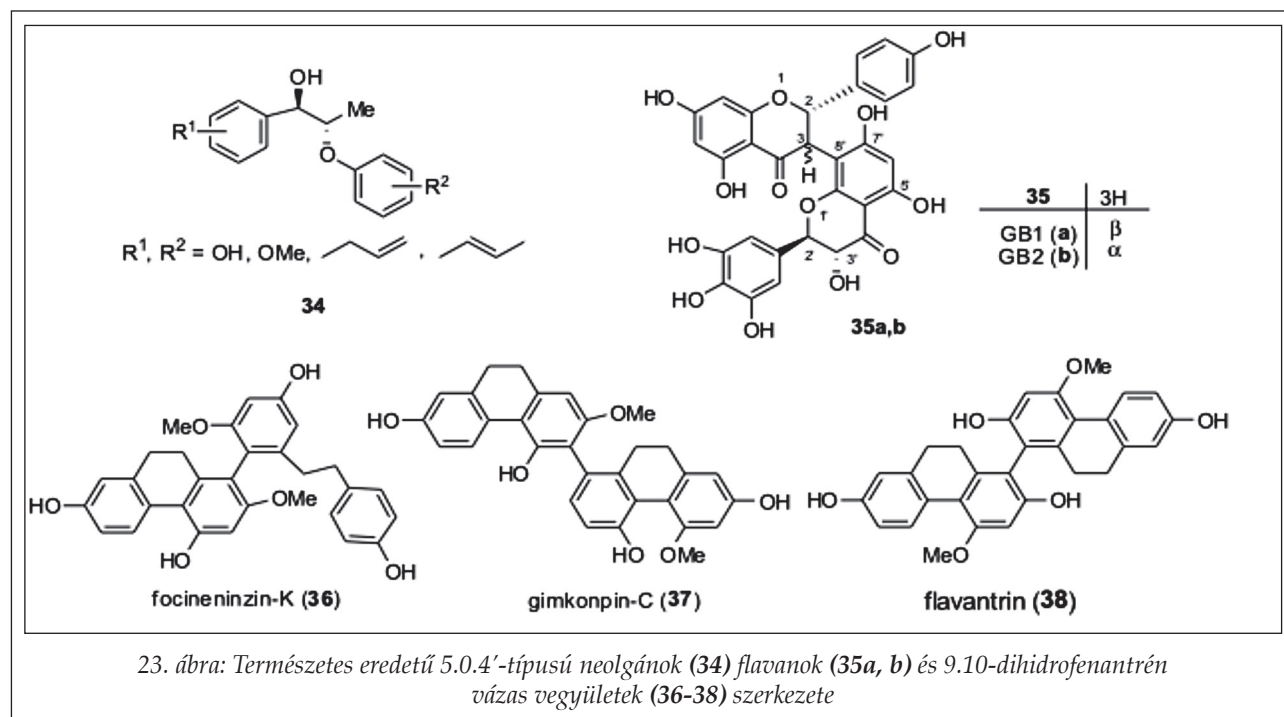
pasztilla készítésének és a színekép felvételének a fentebb említett követelményeknek megfelelő körülményeit és így a laboratóriumunkban a szilárd fázisú CD mérése, majd a TDDFT/ECD számításának meghonosítása az abszolút konfiguráció tudományos igényű meghatározásának új távlatait nyitotta meg. A Paderborni és a Pisai Egyetem kutatóival együttműködve az elmúlt 5 évben e módszerrel nagyszámú biológiailag aktív O-heterociklusos természetes anyag (köztük nagy flexibilitású molekulákét is) abszolút konfigurációját határoztuk meg [50]. E lehetőségeről először a *Phomopsis* sp. endofita gombából izolált (+)-fomoxanton A (32) abszolút konfigurációjának meghatározása kapcsán számoltunk be. E molekulának a centrális kiralitása mellett a C4-C4' tengely mentén fellépő gátolt rotációja miatt *axiális* kiralitása is van. E molekula relatív konfigurációját (aS^* , $5R^*$, $6R^*$, $10aR^*$, $5'R^*$, $6'R^*$) az NMR és az egykristályának röntgen színeképe alapján határoztuk meg. Az oldatban ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 4:1$) mért, valamint a S , $5R$, $6R$, $10aR$, $5'R$, $6'R$, $10a1R$ enantiomerre a röntgenadatokat alapján a TDDFT módszerrel számított ECD spektrumok összehasonlítása egyértelműen azt mutatta, hogy a molekula kiroptikai sajátságaiban az *axiális* (feltehetően az S) kiralitás a meghatározó, és így az oldatban mért CD színeképből az acetofenon kromoforok királis környezetére tudományos igényességgel következtetni nem lehetett. A KBr-ban mért és a röntgen adatok alapján számított CD spektrum összehasonlítása azonban egyértelmű választ adott erre a kérdésre is [50a] (21. ábra).





A szilárd fázisú TDDFT/ECD módszer meghonosítása és a természetes anyagok kémiájának területére történő bevezetése, az elméleti jelentőségén túlmenően – különösen konformációs mozgékony optikailag aktív királis farmakonok esetében – gyógyszerkémiailag jelentőséggel is bír. A *Phoma* sp. endofita gombából izolált 16 tagú lakton gyűrűt tartalmazó antibakteriális hatású tetrahydropirenoforol [(–)-**33**] szerkezetvizsgálata során ugyanis megfigyeltük, hogy a KCl pasztillában mért és a (4S,7R,12S,15R)-enantiomerre a TDDFT módszerrel számított CD spektrum jó egyezést mutatott, míg a metanolban mérttől pedig jelentősen eltért [50b] (22. ábra). Minthogy e flexibilis molekula esetében az AM1 konformációanalízis 3 kcal/mol tartományban 60 konformációs isomert talált és a röntgenszerkezetnek megfelelő konformer közülük csak a 13-ik legalacsonyabb energiájú AM1 konformer volt, így az oldatban legnagyobb koncentrációban jelenlevő, és e molekula biológiai hatásáért felelőssé tehető konformer minden bizonnyal különbözik a kristályrácsban rögzítettől. Ezzel a különbséggel egy esetleges gyógyszerre fejlesztés során a hatás-szerkezet összefüggések vizsgálatánál feltétlenül számolni kell.

A laboratóriumunkban a HPLC-CD vizsgálatokat is eredményesen folytattuk. A természetben

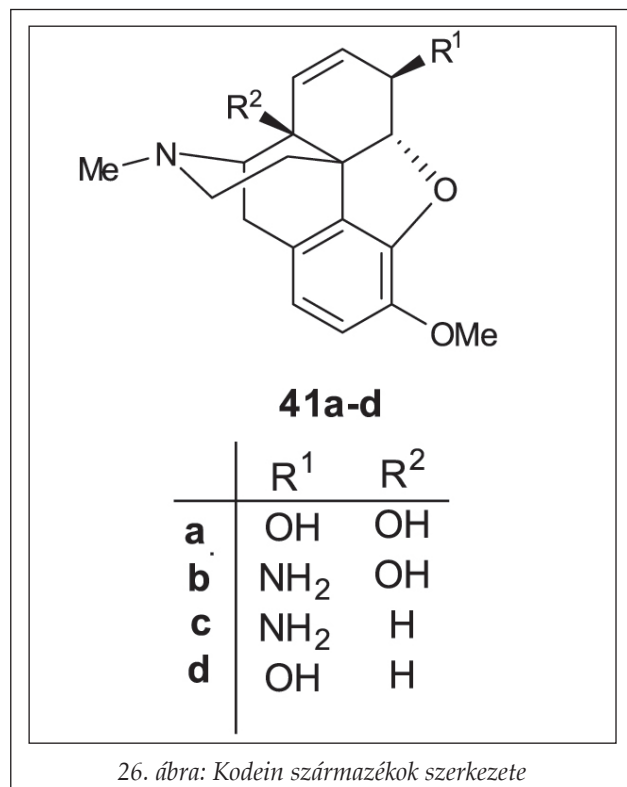
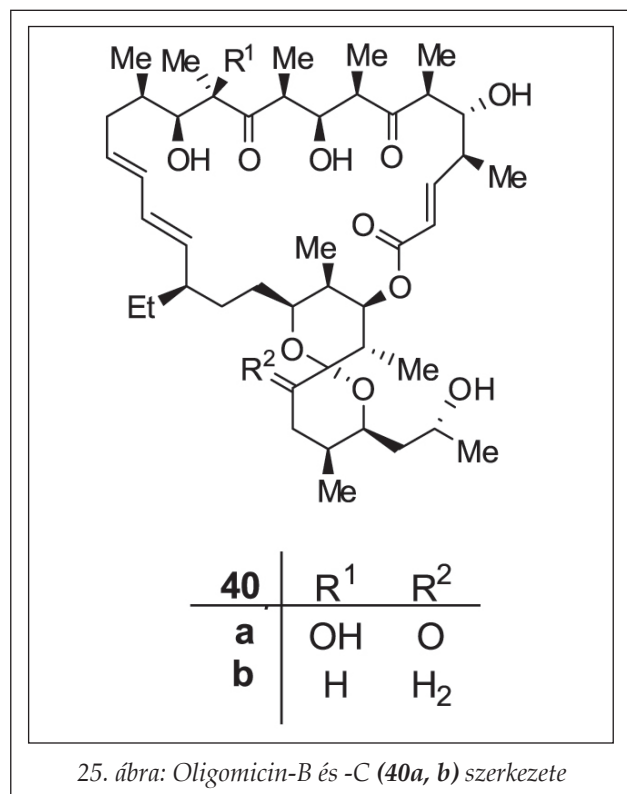


deklódest váltottak ki. A szénhidrátok területén a viszonylag alacsonyabb toxicitású antibiotikum a tobramicin (3) jelhozzárendelésére támaszkodva a mikroszkópius protonálódási állandóit határozták meg NMR- és potenciometriás módszer kombinálásával [54], továbbá

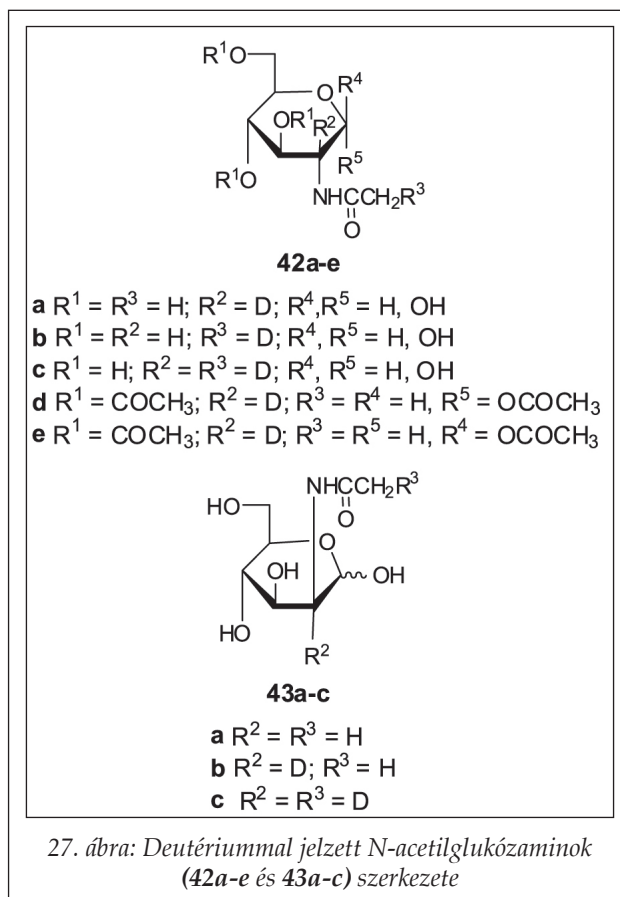
előforduló antioxidáns hatású 5.0.4'-típusú neolignánok (34) abszolút konfigurációjának a meghatározására módszert dolgoztunk ki [51]. Az Afrikában honos gyógynövény, a *Gnidia invocularis*-ből izolált mávédő hatású *racém* 3,8''-biflavonid komponenséről (35a,b) e vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az a 4(R) és -(S) konfigurációjú diasztereomerek (GB1 és GB2) 1:1 arányú keveréke [52]. A *Phalodota chinensis* kínai gyógynövény dihidrofenantrénvázas komponenseinek szerkezetfelfedezése során pedig megállapítottuk, hogy e komponensek közül a focinenin-K (36), gimkonpin-C (37) és a flavantrin (38) is a megfelelő aptopizomerek 1:1 arányú keverékei [53] (23. ábra).

Az NMR spektroszkópiai kutatások a tanszéken 1992 után is egyre szélesedő nemzetközi együttműködések keretében eredményesen folytatódtak. E szerteágazó munka eredményei közül az alábbiakban csak azokat sorolom fel, melyek vagy metodikai szempontból vagy a vizsgált molekula biológiai jelentőségének okán fokozott ér-

vizsgálták az ugyancsak aminoglikozid antibiotikum-családba tartozó apramicin (39) konformációját és rámutattak a relaxációs módszerekben rejlő lehetőségekre a térszerkezet meghatározásában [55] (24. ábra). A „kis” molekulákkal kapcsolatos NMR-kutatások tipikusan a molekulaszervezet (konstitúció, konfiguráció, konformáció) meghatározását célozzák általában oldatfázisban. A feladat megoldásának *sine qua non*-ja az egyértelmű („*ab initio*”) NMR-jelhozzárendelés (^1H , ^{13}C , esetleg ^{15}N , és egyéb magok). Ez már viszonylag kis molekulák esetén sem triviális és általában csak a 2D-módszerek célszerű kombinálásával lehetséges. Ezt példázza a korábban már említett flavofungin (1), melynek a konformációs és H-kötéses viszonyainak részletes leírását tette lehetővé a hozzárendelés alapján mért csatolási állandók és az ún. „SIMPLE”-kísérletekkel [56] történt meghatározása [57]. Az ugyancsak a polién-makrolidok családjába tartozó oligomicinek (40) esetében hasonló közelítést alkalmazva lehetőség nyílt az



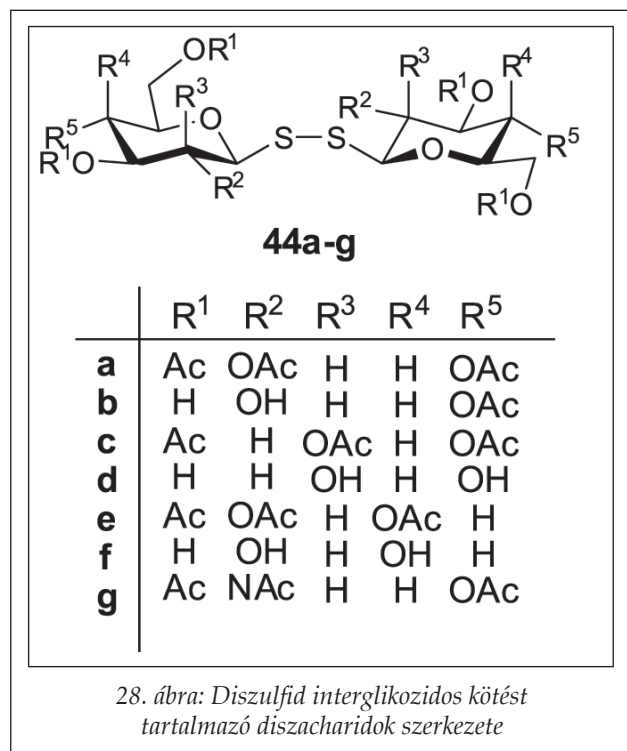
oldatkonformáció és a szilárd fázisú (Rtg-diffrakciós) szerkezet összehasonlítására [58] (25. ábra). A sokkal merevebb gyűrűrendszert tartalmazó kodein-származékokban (41a-d) sikerült szubsztituensek által indukált konformációvál-



tozásokat is azonosítani [59] (26. ábra). A fehérje-NMR kutatásban egy EU-pályázat keretében a humán hasnyálmirigy ribonukleáz másodlagos szerkezetét illetően születtek értékes eredmények [60]. A lizozim EI-komplexek kutatásának [14] folytatásaként pedig a korábban a tanszéken kidolgozott módszerrel többszörösen jelzett NAcGlc-származékokat (42a-e, 43a-c) állítottak elő, és ezek felhasználásával részletesen vizsgálták a komplexek molekuláris dinamikáját [61] (27. ábra).

1995-ben a Bruker DRX500 típusú 500 MHz-es spektrométer üzembe helyezésével a műszerállomány fejlesztésében jelentős előrelépés történt és a kor technológiai színvonalának megfelelően háromcsatornás gradiens egységgel, több mérőfejjel multinukleáris konfigurációban 1996 elejétől napi 24 órás üzemben áll a kutatók rendelkezésére e berendezés. A beruházást Lipták András (OTKA elnöke) és Pungor Ernő (OMFB elnöke) akadémikusoknak a hathatós támogatása, valamint a beszerzési ár kb. 30%-át kitevő EU-hozzájárulás tette lehetővé.

E közlemény sorozat előző részében már részletesen foglalkoztam a szénhidrátvázas antidiabetikus hatású glikogén foszforiláz inhibitorok szintézise területén elért eredményeinkkel [62]. E ve-

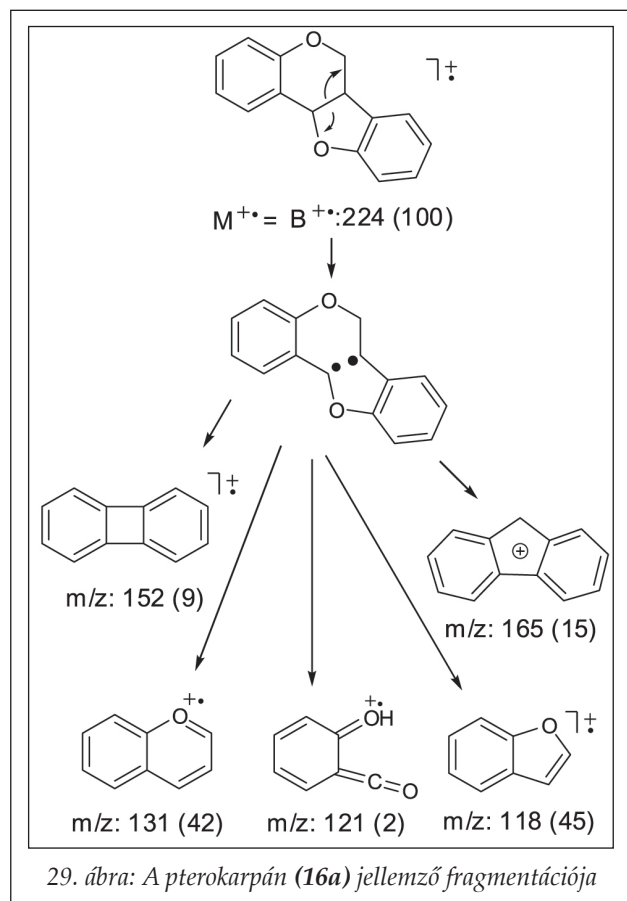


gyületek egyértelmű szerkezet meghatározásban fontos szerepet játszott/játszik a glikozilidén-spiro-heterociklusok a kémiai eltolódásra és proton-szén csatolási állandókra vonatkozó szabály felismerése [63]. Az általánosan alkalmazható NMR módszert sávselektív jel-elnyomásra átfedő 2D spektrumok egyszerűsítésére oligoszacharid példákön dolgozták ki [64]. A *N*-t tartalmazó heterogyűrűs és szénhidrátszármazékok szerkezet meghatározásánál a ¹⁵N-HSQC-, illetve ¹⁵N-HMBC módszereket alkalmazták [65] és e módszer korlátaira rámutatva részletesen tanulmányozták a ¹H-¹³C csatolások alkalmazhatóságát a ketozidok anomer konfigurációjának meghatározásánál [66]. Új típusú, diszulfid-interglikozidos kötést tartalmazó diszacharidok (44a-g) szintézisét oldották meg, melyek konformációját ROESY módszerrel vizsgálták és összevetették a kapott eredményeket a szilárd fázisban mért NMR és CD adatokkal [47a, 67] (28. ábra). A 90-es években egyre elterjedtebbé vált az NMR-adatokra támaszkodó számítógépes molekulamodellzés alkalmazása a konformációs analízisben. Ezt a módszert először sejtfall glikopeptidek konformációjának meghatározására német, illetve szlovén partnerekkel kooperálva hasznosították [68]. Szlovén és dél-afrikai együttműködések keretében hasonló módszerekkel határozták meg a jelentős biológiai hatású oligopeptidek konformációját oldatfázisban [69]. Indiai kutatókkal való együttműködés pedig lehetővé

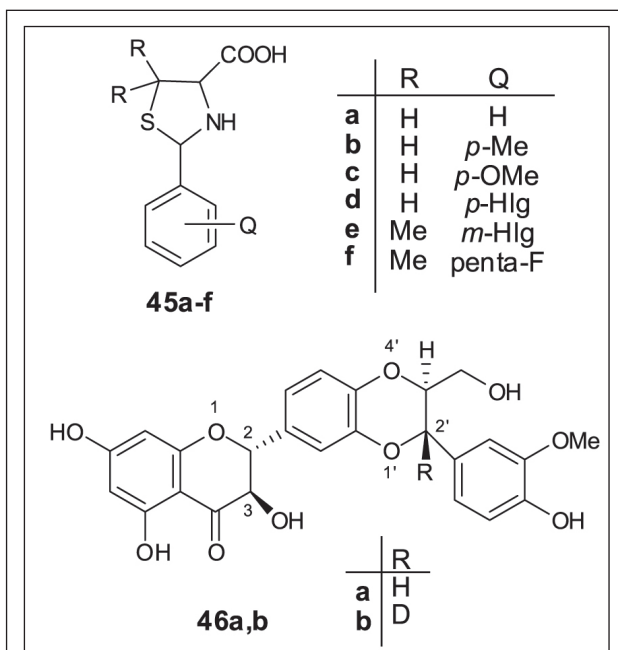
tette, hogy tanulmányozzák a már fentebb említett oligovalens diszulfid-glikozidok a concanavalin-A lektin-fehérjéhez való kötődését. A kötődés specifikását telítés-átvitel-differencia (STD) NMR módszerrel sikerült egyértelműen bizonyítani [70].

1992-2008 között a tömegspektrometriai kutatások területén is számos értékes eredmény született. A különböző szerves anyagok szenesedési vizsgálata során GC-MS vizsgálatokkal kimutatták, hogy a toluolból nagyfeszültségű (20kV) 50 Hz frekvenciájú váltóáram hatására számos pol ciklusos aromás szénhidrogén (fullerén építőelem) keletkezett, melyek szerkezetüktől függő sebességgel alakultak át C60 fullerénné. A MALDI TOF MS vizsgálatokkal pedig rádiófrekvenciás plazmában (4kV, 27 MHz) a szenesedés során nemcsak C60, hanem C70 fullerén keletkezését is igazolták, valamint megfigyelték, hogy nitrogén atomoszférában a fentiek mellett nitrogéntartalmú intermedierék (például 1- és 2-cianonaftalin) is keletkeztek [71].

A flavanoidok körében végzett korábbi kutatásaink [26a] folytatásaként a debreceni nagyerdőben is honos feketenyár (*Populus nigra*) rügyének polifenol összetételét vizsgáltuk GC-LC-MS módszerrel és 133 vegyületet – közöttük számos szénhidráttartalmú flavonoidot is – azonosítottunk. A négy év alatt gyűjtött mintanyag részletes elemzése azt is megmutatta, hogy a szénhidrát tartalmú komponensek mennyisége a rügyérés során elsősorban a napsugaras órák számától függ és a 26-27%-os flavonoid tartalomnak közel az egyharmadát a glikozidjaik teszik ki. Minthogy a nyárfarügy a méhek egyik kedvelt gyűjtési helye, így vizsgálataink a népi gyógyászatban és a kozmetikai iparban használt propolisz összetételéről adtak értékes felvilágosítást [72]. A GC-MS vizsgálataink folytatását nagymértékben megkönnyítte, hogy 1998 őszén Mihókné dr. Borbély Ildikó a TEVA debreceni gyáregységének kutatási igazgatója a gyár vezetésnél elérte, hogy az újszerű állapotban lévő 5988 típusú GC-MS készüléküket költségtérítés nélkül a tanszék kapja meg. Ezt használtuk a régió legismertebb boraiban (1983-as évjáratú Tokaji aszu; 1995, 1996 és 1997-es évjáratú Egri bika-vér, 1997-es évjáratú Kékfrankos; 1997-es évjáratú Medina) a nem illékony komponensek vizsgálatánál is. Nagyszámú (>20) polifenolszármazékot azonosítottunk, közöttük a bor „egészségmegőrző hatásáért leinkább felelőssé tehető *transz*-rezveratrolt és 3-O-β-D-glükozidját (picein) is. E borközül érdekes módon az 1997-es évjáratú Egri Medina polifenoltartalma nemcsak meglehetősen



alacsony volt, hanem rezveratrol származékokat sem tartalmazott. A vizsgálataink során azt is megfigyeltük, hogy e mátrixból a polifenolok kimutatásánál az elektronionizáció (EI) helyett, az elektronspray (ESI) vagy a szonikus (SSI) ionizációs technikát célszerűbb alkalmazni [73]. A természetes eredetű pterokarpánok szerkeztfelderítésével már a kiroptikai kutatásaink ismertetésekor is foglalkoztam. Jóllehet e biológiailag is értékes vegyületek szerkeztfelderítése során nagyszámú tömegspektrometriai adatot közöltek az irodalomban, meglepő módon azonban, a fragmentációjukat részletesen nem tanulmányozták. E vizsgálatokhoz szerkeztbizonyító szintézissel a *racem* **16a** pterokarpán C-6, C-6a és C-11a helyzetben deuteriumot tartalmazó származékait (a megfelelő mono-, di- és trideutero vegyületeket) állítottuk elő és a fragmentációjukat HR és CID-MIKE módszerekkel tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy az elektroműközéssel keletkező molekuláion a 29. ábrán feltüntetett módon alakul át [74]. A deuterium jelzés alkalmazása tette lehetővé a nem illékony és/vagy termikusan instabil molekulákban lévő különféle típusú aktiv hidrogének egyszerű tömegspektrometriás kimutatását és kvantitatív meghatározását is [75]. Hasonlóan a redukáló

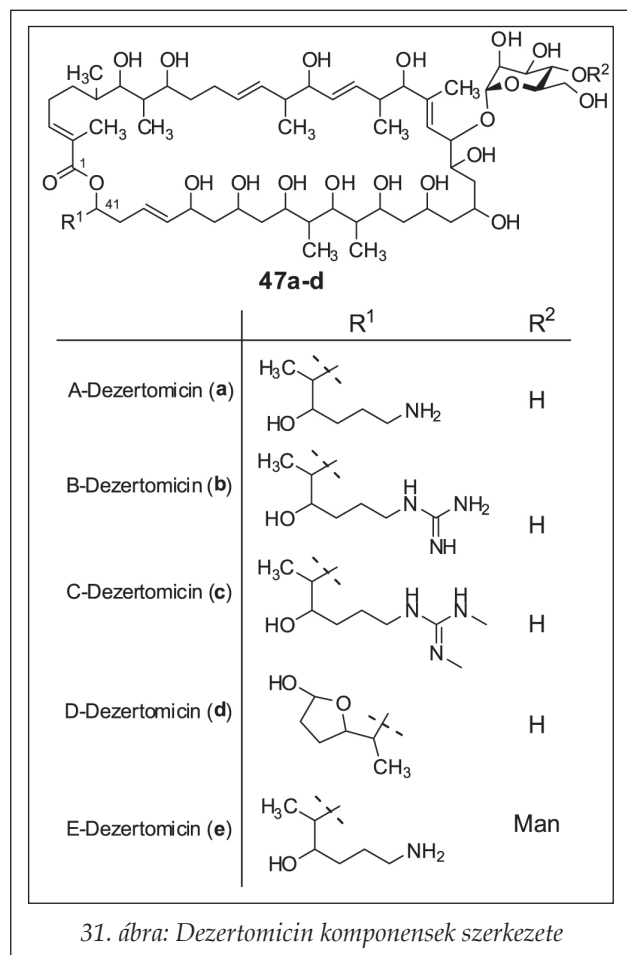


30. ábra: 2-Aryl-thiazolidin karbonsavak (**45a-f**), a (+) szilibinin (**46a**) és a (+)-2'-D-szilibinin (**46b**) szerkezete

szénhidrátokhoz, a flavanonok körében is megvalósul a gyűrű-lánc tautóméria. Ez esetben a gyűrűfelnyílás során a megfelelő 2'-hidroxikalkon keletkezik. Érdekes módon a gyors izomerizáció miatt az EI-tömegspektromaik, még CID körülmények között is teljesen azonosak. Sikertült azonban kimutatni, hogy a kettős töltésű molekuláionok már nem izomerizálódnak és így e vegyületek a MIKE spektrumaik alapján már könnyen megkülönböztethetők [76]. A 2-aryl-thiazolidin-4-karbonsavak (**45a-f**) és a gyógyászatban hazánkban is forgalomban lévő májvédő hatású (+)-szilibinin (**46a**) [Silegon 140 /Teva Magyarország Zrt.] és 2'-deuterált származékának (**46b**) fragmentációját tanulmányozva pedig megteremtettük az ilyen típusú vegyületek egyszerű azonosításának lehetőségét [77] (30. ábra).

Az antibiotikumok kutatása során is számos értékes tömegspektrometriai eredmény született. A széles spektrumú antibiotikumot, a dezertomicint debreceni kutatók 1958-ban a Szaharából származó homokmintából izolálták [78] és a fő komponenseinek, a dezertomicin A-nak (**47a**) és B-nek (**47b**) a móltömegét, valamint elemi összetételét nagyfelbontású FAB tömegspektrometriai mérésekkel határozták meg [26e,79]. Az EI FAB, ES LC-MS/MS és a MALDI-TOF tömegspektrometriai módszerek kombinált alkalmazása pedig lehetővé tette négy újabb származék (**47c-f**) szerkeztazonosítását is [80] (31. ábra).

A tömegspektrometriai vizsgálatok a szénhidrátkémiai kutatásainkhoz is hatékony segítséget



nyújtottak, melyek közül az anomer effektus vizsgálatát emelem ki. Az 1,1-diszubsztituált hexopiranozidok tömegspektromteriai vizsgálata során megfigyelték ugyanis, hogy az anomer centrum szubsztituenseinek vesztésével képződő ionok intenzitás hányadosa az abszolút konfiguráció alapján szoros összefüggés van [80].

Dr. Dinya Zoltán egyetemi docens az MTA doktora fokozatot megszerzve a nyugdíjazását (2005) követően a Nyíregyházi Főiskolára kapott egyetemi tanári kinevezést és azóta az Agrár és Molekuláris Kutató Intézet igazgatójaként végez eredményes kutató munkát. A munkakörét a tanszékünkön Kiss-Szikszai Attila (PhD, Debreceni Egyetem, 2005) vette át, aki már az elválasztástechnikai módszerek (GC és HPLC) alkalmazása területén is széles körű tapasztalatokat szerzett [51-53, 81].

3. Köszönetnyilvánítás

E helyütt is köszönetemet fejezem ki szerkezet-vizsgáló módszerek alkalmazását bemutató közlemények szerzőinek az értékes és áldozatos munkájukért, mellyel a tanszék nemzetközi elismert-

ségét öregbítették. Külön is megköszönöm Batta Gyula, Dinya Zoltán, Hollósi Miklós, Kövér Katalin, Simonyi Miklós és Szilágyi László egyetemi tanároknak és munkatársaiknak (dr. Pócsfalvi Gabriella, dr. Kajtár Judit, dr. Majer Zsuzsa, dr. Szókán Gyula, dr. Zsila Ferenc, dr. Varró Katalin, dr. Visy Júlia), valamint dr. Kurtán Tibor adjunktusnak és dr. Kiss-Szikszai Attila tudományos munkatársnak, hogy a tudásuk legjavát adva dolgoztak és a tapasztalataikat számos hallgatóval is megosztva lehetővé tették, hogy a nemzetközileg is elimert kutatásink mellett eredményes oktatás folyjon e területen. Megköszönöm Mándi Attila doktorandusznak, hogy a CD színeképek kvantumémiai számítását megtanulta, mellyel a kutató munkánk eredményességéhez jelentősen hozzájárult. Köszönettel tartozom Balla Sára és Deák Edina vegyésztéchnikusoknak, Tóth Ákos elektromérnöknek és Komáromi Péter műszerésznek, hogy színvonalas munkájukkal a tanszék oktató-kutató munkáját hatékonyan segítették.

Hálával és köszönettel tartozom Péczely Antal és Árva Imre üvegtechnikusoknak, hogy művészi szinten „önköltséggel” végezett gondos munkájukkal nemcsak az oktató-kutató munkánkat segítették, hanem jelentősen hozzájárultak a tanszék általános működési költségeinek csökkentéséhez is.

E közlemény összeállításában nyújtott hathatós segítségért Dinya Zoltán és Szilágyi László egyetemi tanároknak, Szabó Edit adminisztrátornak és Herczeg Mihály doktorandusznak mondok köszönetet.

A kutatásainkat az ABLE&E-Jasco Magyarország Kft., a Richter Gedeon Nyrt., a Teva Magyarország Zrt. és az OTKA támogatta [I/3-17772 (1991-1994), T-029090 (1999-2001), -28814 (1997-2000), -34515 (2001-2005), -34250 (2001-2004), -042550 (2003-2006), -48713 (2005-2009), -049436 (2005-2009), NI61336 (2006-2010), K81701(2010-2014)], melyért e helyütt is az őszinte köszönetünket fejezzük ki.

IRODALOM

1. a) Bognár, R., Szabó, V., Dávid, É.: Ultraviolettabsorptionsspektren von Isoflavonen. Acta Phys. Chem. Szeged, 5, 6-18 (1959); b) Dávid, É., Bognár R.: Flavonoidok, VIII. A 2'-Hidroxikalkon-flavanon átalakulás vizsgálata spektrofotometriás úton. Acta Univ. (Debrecen), 7, 141-148 (1961); c) Dávid, É., Bognár, R., Rákosi, M.: Ultraviolette Absorptionsuntersuchungen der Thioflavonoidverbindungen. Acta Phys. Chim. (Debrecen), 10, 97-109 (1965); d) Dávid, É., Rákosi, M., Bálint, J., Bognár R.: Ultraviolette Absorptionsuntersuchungen und die relative Basizität von Thioflavonoid Verbindungen II. Acta Phys. Chim. (Debrecen), 15-16, 163-180 (1970); e) Dinya, Z., Sztaricskai, F.: Ultraviolet and Light Absorp-

- tion Spectrometry, in Modern Analysis of Antibiotics (Ed. by A. Aszalós) *Drugs and the Pharmaceutical Science*. Vol. 27, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel. pp.20-96 (1986).
2. a) Nánási, P., Cerletti, P.: Gli spettri infrarossi di N-p-tolil-D-glicosilamine isomere e dei loro derivati. *Gaz. Chim. Ital.* 92, 576-582 (1962); b) Nánási, P., Nemes-Nánási, É., Cerletti, P.: Ricerche spettroscopiche sui prodotti di condensazione della cisteina con zuccheri. *Gaz. Chim. Ital.*, 92, 583-586 (1962); c) Nánási, P., Nemes-Nánási, É., Cerletti, P.: Spettroscopia nell'infrarosso di N-glucosidi. -Nota II. Identificazione della struttura e dell' isomeria nell' anello in eteri metilici di N-glucosidi. *Gaz. Chim. Ital.* 95, 966-974 (1965); d) Dinya, Z., Szabó, S.: Flavonoidok és modellvegyületeik IR és kvantumkémiai vizsgálata. I. A 4-szubsztituált acetofenonok néhány IR frekvenciájának vizsgálata HMO számítás útján. *Magy. Kém. Foly.* 77, 426 (1971).
 3. a) Dinya, Z., Makleit, S., Jékel P.: Quantum chemical Calculations for Morphine Alkaloids. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 71, 125-126 (1972); b) Dinya, Z.: Infrared Spectroscopic Studies on Flavonoids and Model Compounds, III. Study of the Infrared Spectrum of 4- and 4'-Monosubstituted Chalcones by the HMO Method. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 73, 453-467 (1972).
 4. Hudson, C.S.: The significance of certain numerical relations in the sugar group. *J. Am. Chem. Soc.* 31, 66-86 (1909).
 5. a) Lipták, A.: Optikai forgatóképességi vizsgálatok analóg szerkezetű O- és N-glikozidok körében. Egyetemi doktori értekezés. Debrecen, (1966); b) Lipták, A., Bognár, R.: Aromás oxigénglikozidok optikai forgatása különböző oldószerekben. *Magy. Kém. Foly.* 77, 204-210 (1971); c) Lipták, A., Bognár, R.: N-glikozidok XV. A Hudson-szabály érvényessége analóg szerkezetű aromás O- és glükozidszármazékok körében. *Magy. Kém. Foly.* 77, 277-281 (1971), *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 72, 309-316 (1972); d) Lipták, A., Bognár, R.: N-glikozidok XVI. Az N-glikozid-metiléterek anomeria-viszonyairól. *Magy. Kém. Foly.* 77, 281-285 (1971) *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 73, 335-341 (1972).
 6. a) Djerassi, C.: Optical Rotatory Dispersion. McGraw-Hill. New York, (1960); b) Crabbe, D.: Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry. Holden-Day. (San Francisco, London, Amsterdam (1965); c) Sznatzke, G.: Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry. Heyden and Son. London, (1967).
 7. a) Sznatzke, G., Werner-Zamojska, F., Szilágyi, L., Bognár, R., Farkas, I.: Chiroptische Eigenschaften von Zucker-Benzotiazol- und Benzotiazolin-Derivaten. *Tetrahedron*. 28, 4197-4208 (1972); b) Sznatzke, G., Sznatzke, F., Tőkés, A.L., Rákosi, M., Bognár, R.: Chiroptical Properties of 4-Substituted Flavans. *Tetrahedron*. 29, 909-912 (1973); c) Lévai, A., Lipták, A., Pintér, I., Sznatzke, G.: Chiroptical Properties of Some Mono- and Polysubstituted Phenyl Glycosides. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 84, 99-107 (1975); d) Bognár, R., Gaál, Gy., Kerekes, P., Lévai, A., Makleit, S., Sznatzke, F., Sznatzke, G.: Chiroptical Properties of Morphinan Derivatives Collection Czechoslov. Chem Commun. 40, 670-680 (1975).
 8. a) Lévai, A., Bognár R., Peciar, C., Bystricky, S., Sticzai, T.: Circular Dichroism Studies X. Chiroptical Differentiation of Isoflavone Glycosides. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 79, 365-367 (1973); b) Sticzai, T., Peciar, C., Bauer, S., Tőkés, A., Lévai, A.: Optical rotatory dispersion studies, VII. Substituted phenyl-glucopyranosides. *Chem. Zvesti.* 28, 90-93 1. (1974); c) Sticzai, T., Bystricky, S., Peciar, C., Lévai, A.: Studies on circular dichroism, XII. Chiroptical properties of some flavone and isoflavone glycosides. *Chem. Zvesti.* 29, 538-543 1. (1975).
 9. a) Györgydeák, Z., Lévai, A., Sznatzke, G.: Chiroptical Properties of Optically Active Thiazolidines Derived from Aldoses and Natural Mercapto-amino Acids. *Croat. Chem. Acta.* 60, 185-200 (1987); b) Lipták, A., Frelek, J., Sznatzke, G., Vlahov, I.: Chiroptical Properties of Pyranoid Glycols in the Presence of $\text{Mo}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$. *Carbohydr. Res.* 164, 149-159 (1987); c) Jodál, J., Kovács, A., Ott, J., Sznatzke, G.: Inter- and Intramolecular Chiral Stacking of Acridine Derivatives. *Chem. Ber.* 122, 1207-1210 (1989); d.) Ciechanowicz-Rutkowska, M., Grochowski, J., Lévai, A., Puzicha, G., Serda, P., Sznatzke, G.: CD Spectra of Optically Active 2-Phenyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-ones and Related 3-Phenylthio-3-phenylpropionic Acid Derivatives, and X-Ray Diffraction of one Phenylethylamide. *Monatsh. Chem.* 120, 981-990 (1989); e) Puzicha, G., Lévai, A., Sznatzke, G.: M. CD Spectra of Optically Active 2-Methyl-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-ones and Related 3-Phenylthio-butyric Acid Derivatives *Monatsh. Chem.* 121, 293-298 (1990); f) Lévai, A., Ott, J., Sznatzke, G.: CD of Optically Active 2,3-Dihydro-2-methyl-1,5-benzoxazepin-4(5H)-ones. *Monatsh. Chem.* 124, 65-69 (1993).
 10. Rákosi, M., Fletcher, M., Philbin, E.M., Wheeler, T.S.: Stereochemistry of Flavan-3,4-diols. *Tetrahedron*. 19, 391-394 (1963).
 11. Uri, J., Békési, I.: Flavofungin, a New Crystalline Antifungal Antibiotic: Origin and Biological Properties. *Nature*. 181, 908-911 (1958).
 12. a) Szilágyi, L., Bognár, R., Farkas, I.: Heterocyclic compounds from sugars. Part VI. The conformations of 2-(polyhydroxyalkyl)- and 2-(polyacetoxyalkyl)benzothiazoles. *An NMR study*. *Carbohydr. Res.* 6, 305-313 (1973); b) Bognár, R., Györgydeák, Z., Szilágyi, L., Somogyi, L.: Heterocyclische Verbindungen aus Zuckern, VII. Die Umsetzung von al-D-Galactosederivaten mit L-Cystein. Beiträge zur Stereochemie von 2-(Polyhydroxyalkyl)thiazolidin-4-Carbonsäuren. *Liebigs Ann. Chem.* 1637-1657 (1975); c) Bognár, R., Györgydeák, Z., Szilágyi, L., Horváth, G., Czira, G., Radics, L.: Heterocyclische Verbindungen aus Zuckern, IX. An C-2 Epimere 2-(L-arabino-Tetrahydroxybutyl)-4(R)-thiazolidin-Carbonsäuren. *Liebigs Ann. Chem.* 450-462 (1976).
 13. a) Bognár, R., Tőkés, A.L., Szilágyi, L.: Flavanoids, XXX. C-4-substituted flavane derivatives. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 86, 269-277 (1975), b) Szilágyi, L., Györgydeák, Z.: P.M.R. studies of some open-chain derivatives obtained from L-arabinose and L-cysteine. *Carbohydr. Res.* 48, 159-169 (1976).
 14. Szilágyi, L., Harangi, J., Radics, L.: Molecular dynamics through ^2H spin-lattice relaxation time measurements within an enzyme-inhibitor complex: lysozyme and methyl N-acetyl glucosaminides. *Biophys.Chem.* 6, 201-211 (1977).
 15. a) Kónya, J., Jóna, I., Kövér, A., Szilágyi, L.: Analysis of coffee effect eliciting muscle contracture. *Stud. Biophys.*, 56, 39-40 (1976); b) Gáspár Jr, R., Szilágyi, L., Damjanovich, S.: The interaction of glycogen phosphorylase b and glucose-1-phosphate studied by proton magnetic resonance. *Stud. Biophys.* 62, 217-222 (1977).
 16. Szilágyi, L., Györgydeák, Z.: Comments on the putative stereoselectivity in cysteine-aldehyde reactions. Selective C(2) inversion and C(4) epimerization in thiazolidine-4-carboxylic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 427-432 (1979).

17. Szilágyi, L.: Combined application of two-dimensional techniques for complete, unambiguous assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of cellobiononitrile octaacetate Carbohydr. Res. 118, 269-275 (1983).
18. Szilágyi, L., Györgydeák, Z.: A ^{13}C NMR investigation of glycosyl azides and other azido sugars: stereochemical influences on the one-bond ^{13}C - ^1H coupling constants Carbohydr. Res. 143, 21-41 (1985).
19. Szilágyi, L.: Assignments of the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of tobramycin at low and high pH. Carbohydr. Res. 170, 1-17 (1987).
20. Wüthrich, K.: NMR of Proteins & Nucleic Acids. 292 p., Wiley, New York (1986).
21. a) Szilágyi, L.: Two-dimensional NMR spectroscopy and its application to the study of protein structure in solution. In: Steric Aspects of Biomolecular Interactions (Eds. G. Náray-Szabó and K. Simon), CRC Press, Boca Raton. Florida, pp. 45-87 (1987); b) Arrowsmith, C., Treat-Clemons, L., Szilágyi, L., Pachter, R., Jardetzky, O.: The use of selective deuteration for the sequence specific ^1H NMR assignment of larger proteins. Makromol. Chem. Macromol. Symp. 34, 33-46 (1990); c) Szilágyi, L., Jardetzky, O.: Alpha-proton chemical shifts and secondary structure in proteins. J. Magn. Reson. 83, 441-449 (1989).
22. a) Szilágyi, L.: „Mágneses rezonancia”, 252 old., Tankönyvkiadó. Budapest, (1977); b) Szilágyi, L.: “ ^1H NMR spektrumok”, 160 old., Tankönyvkiadó. Budapest, (1979).
23. Szilágyi, L., Sándor, P.: NMR spektroszkópia, in: Molekulaspektroszkópia (Szerk. Kovács I. és Szőke J.), Akadémiai Kiadó. Budapest, pp. 658-718 (1987).
24. Szpiridonova, I.A., Lomakina, N.N., Sztaricskai, F., Bognár, R.: Sztruktúra risztoszamin-aminoszahara iz antibiotika risztomicina. Antibiotiki. 19, 400-405 (1974).
25. a) Bognár, R., Sztaricskai, F., Munk, M.E., Tamás, J.: Structure and stereochemistry of ristosamine. J. Org. Chem. 39, 2971-2974 (1974); b) Sztaricskai, F., Pelyvás, I., Szilágyi, L., Bognár, R., Tamás, J., Neszmélyi, A.: A synthesis of L-ristosamine and a derivative of its C-4 epimer, Carbohydr. Res. 65, 193-200 (1978).
26. a) Nagy, É., Pápay, V., Litkei, Gy., Dinya Z.: Investigation of the Chemical Constituents, particularly the flavonoid components of Propolis and Populei Gemma by the GC/MS Method. In: Flavonoids and Bioflavonoids. 1985. Eds.: Farkas, L., Gábor, M., Kállay, F.: Elsevier. 223-232 (1986); b) Bax, A., Azsalós, A., Dinya, Z.: Structure Elucidation of the Antibiotic Desertomycin through the Use of New-Dimensional NMR Techniques. J. Am. Chem. Soc. 108, 8056-8063 (1986); c) Somogyi, G., Dinya, Z., Laczikó, A., Prókai, L.: Mass spectrometric Identification of Thin Layer Chromatographic Spots: Implementation of a Modified Wick-Stick Technique. J. Planar Chromatography. 3, 191-193 (1990); d) Tóth, G., Lévai, A., Dinya, Z., Sznatzke, G.: Thermal Decomposition of some New Spiro-2-Pyrasolines. Tetrahedron, 47, 8119-8132 (1991); e) Dinya, Z., Sztaricskai, F., Horváth, G.: Structure Determination of the Antibiotic Desertomycin B by Fast Bombardment Mass Spectrometric Techniques. Rapid Comm. In Mass Spectrometry 5, 534-537 (1991); f) Lipták, M., Dinya, Z., Sztaricskai, F., Litkei, Gy., Jekő, J.: Liquid Chromatography / Thermospray Mass Spectrometry of Monosaccharides and their Derivatives. Org. Mass. Spectrometry. 27, 1271-1275 (1992).
27. Beck, M.T., Dinya, Z., Kéki, S.: Formation of Polycyclic Aromatic Compounds upon Electric Discharges in Liquid Toluene. Tetrahedron. 48, 4919-4928 (1992), e) Beck, M.T., Dinya, Z., Kéki, S., Papp, L.: Formation of C_{60} and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons upon Electric Discharges in Liquid Toluene. Tetrahedron. 49, 285-290 (1993).
28. Sznatzke, G.: Circular dichroismus X. Modifizierung der Oktanregel für d,b-ungesättigte Ketone: cisoide Enone, Dienone und Arylketone. Tetrahedron. 21, 439-449 (1965).
29. Antus, S., Baitz-Gács, E., Kajtár, J., Sznatzke, G., Tókes, A.L.: Circular Dichroism and Absolute Configuration of Aza- and Tiaflavanones. Liebigs Ann. Chem. 497-502 (1994).
30. a) Sznatzke, G., Ho, P.C.: Circular dichroismus XLVI. Rules for Benzene Cotton-Effects. Tetrahedron. 27, 3345-3653 (1971); b) Sznatzke, G., Kajtár, M., Sznatzke, F.: Influence of Substitution Pattern on the Benzene ^1Lb -band Cotton-effect. Tetrahedron. 28, 281-288 (1972).
31. a) Platt, J.R.: Spectroscopic moment: a parameter of substituent group determining aromatic ultraviolet intensities. J. Chem. Phys. 19, 263-266 (1951); b) Petraska, A.: Changes in the electronic transitions of aromatic hydrocarbons on chemical substitution. J. Chem. Phys. 34, 1120-1136 (1951).
32. a) Antus, S., Sznatzke, G., Steinke, I.: Synthese und Circular dichroismus von Steroiden mit Isochromanon-Chromophor. Liebigs Ann. Chem. 2247-2261 (1989); b) Antus, S., Baitz-Gács, E., Sznatzke, G., Tóth, T.: Synthesis and Circular Dichroism of Steroids with 1,4-Benzodioxane Chromophore: On the Absolute Configuration of (-)-Silandrin. Liebigs Ann. Chem. 633-641 (1991).
33. Kurtán, T., Baitz-Gács, E., Májer, Zs., Bényei, A., Antus, S.: Resolution and Configurational Assignment of 2H-3,4,5,6-Tetrahydro-2-methyl-2,6-methano-1-benzoxacin Derivatives. J. Chem. Soc. Perkin 1. 7, 888-894 (2002).
34. Czompa, A., Kovács, T., Antus S.: Lipase-Catalysed Kinetic Resolution of Hydroxymethylchromanes. J. Het. Chem. 37, 991-995 (2000).
35. a) Garo, E., Maillard, M., Antus, S., Mavi, S., Hostettmann K.: Five Flavans from *Mariscus psilostachys*. Phytochemistry. 43, 1265-1269 (1996); b) Antus, S., Kurtán, T., Juhász, L., Kiss, L., Hollósi, M., Majer Zs.: Chiroptical Properties of 2,3-Dihydro[b]furan and Chromane Chromophores in Naturally Occurring O-Heterocycles. Chirality. 13, 493-506 (2001).
36. Kurtán, T., Baitz-Gács, E., Majer, Zs., Antus, S.: Synthesis and Circular Dichroism of Steroids with 2,3-Dihydro-1-benzofuran and 4H-Benzopyran Chromophores; Revision of the Absolute Configuration of Some Norneolignans from *Krameria Cystisoides*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 453-461 (2003).
37. Achenbach, H., Gross, I., Domínguez, X.A., Cano, G., Star, I.V. Brussolo, L.C., Muñoz, G., Salgado, F., Lopez, L.: Lignans, neolignans and norneolignans from *Krameria cystisoides*. Phytochemistry. 26, 1159-1166 (1995).
38. a) Juhász, L., Szilágyi, L., Antus, S., Visy J., Zsila, F., Simonyi, M.: New Insight into the Mechanism of Hypervalent Iodine Oxidation of Flavanones. Tetrahedron. 58, 4261-4265 (2002); b) Juhász, L., Visy, J., Simonyi, M., Krohn, K., Antus, S.: Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of (\pm)-trans-2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxymethyl-7-methoxy-2,3-dihydrobenzo[b]furan. Tetrahedron-Asymmetr. 13, 1219-1222 (2002).
39. a) Perrin, D.R., Cruickshank, L.A.M.: The antifungal activity of pterocarpan towards *Monilia fructicola*. Phytochemistry. 8, 971-978 (1969); b) Engler, T.A.; Lynch, O.K., Reddy, J.P. Gregory, G.S.: Synthetic pterocarpan with anti-HIV activity. Biorg. Med. Chem. Lett. 6, 1229-1232 (1993); c) Etten van H.D.: Antifungal activity of

- terocarpanes and other isoflavanoids. *Phytochemistry*. 15, 655-659 (1976); d) Nakagawa, M., Nakanishi, K., Darko, L.L., Vick, J.A.: Structures of cabenegrins A-I and A-II, potent anti-snake venoms. *Tetrahedron Lett.* 23, 855-858 (1982).
40. Antus, S., Bauer, R., Gottsegen, Á., Wagner, H.: Enantiomeric Separation of Racemic Pterocarpanes by High-performance Liquid-chromatography on (+)-Poly(triphenylmethyl methacrylate)-coated Silica-gel. *J. Chrom.* 508, 212-216 (1990).
 41. Szarvas, Sz., Szókán, Gy., Hollósi, M., Kiss, L., Antus, S.: Determination of the Absolute Configuration of Synthetic Pterocarpanes by Chiral HPLC Using On-Line CD Detection. *Enantiomer*. 5, 535-543 (2001).
 42. Kiss, L., Kurtán, T., Antus, S., Bényei, A.: Chiroptical Properties and Synthesis of Enantiopure *cis* and *trans* Pterocarpin Skeleton. *Chirality*. 15, 558-563 (2003).
 43. Krohn, K., Bahramsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Klichepory, Ch., Michel, A., Aust, H.-J., Dräeger, S., Schulz, B., Antus, S.: Dihydroisocoumarin from Fungi: Isolation, Elucidation, Circular Dichroism and Biological Activity. *Phytochemistry*. 45, 313-320 (1997).
 44. Krohn, K., Flörke, U., John, M., Root, N., Steingröver, K., Aust, H.-J., Dräeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M., Zsila, F.: Biologically Active Metabolites from Fungi, 16. New Preussomerins J, K and L from an Endophytic Fungus: Structure Elucidation, Crystal Structure Analysis and Determination of Absolute Configuration by CD Calculations. *Tetrahedron*. 57, 4343-4348 (2001).
 45. a) Bergeron, C., Marston, A., Antus, S., Gauthier, R., Hostettmann, K.: Flavonoids from *Pyrola elliptica* (Pyrolaceae). *Phytochemistry*. 49, 233-236 (1998); b) Garo, E., Wolfender, J.-L., Hostettmann, K., Hiller, W., Mavi, S., Antus, S.: Prenylated Flavanones from *Monotes engleri*: On-line Structure Elucidation by LC/UV/NMR. *Helv. Chim. Acta*. 81, 754-763 (1998); c) Raelison, G.E., Terreaux, C., Queiroz, E.F., Zsila, F., Simonyi, M., Antus, S., Randrianitsoa, A., Hostettmann, K.: Absolute Configuration of Two New 6-Alkylated α -Pyrone (=2H-Pyran-2-ones) from *Ravensara crassifolia*. *Helv. Chim. Acta*. 84, 3470-3476 (2001); d) Querioz, E.F., Antindehou, K.K., Terreaux, C., Antus, S., Hostettmann, K.: Prenylated Isoflavanoids from the Root Bark of *Erythria vogelii*. *J. Nat. Prod.* 65, 403-406 (2002).
 46. a) Kurtán, T., Nesnas, N., Li, Y.Q., Huang, X.F., Nakanishi, K., Berova, N.: Chiral recognition by CD-sensitive dimeric zinc porphyrin host 1. Chiroptical protocol for absolute configuration assignments of monoalcohols and primary monoamines. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5962-5973 (2001); b) Kurtán, T., Nesnas, N., Koech, F.E., Li, Y.Q., Nakanishi, K., Berova, N.: Chiral recognition by CD-sensitive dimeric zinc porphyrin host 2. Structural studies of host-guest complexes with chiral alcohols and monoamine conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5974-5982 (2001).
 47. a) Praly, J.-P., diStefano, C., Somsák, L., Hollósi, M., Majer, Zs., Voelter, W.: Structure of C-1 substituted glycopyranosyl azides: new insights based on CD measurements. *Tetrahedron-Asym.* 10, 901-911 (1999); b) Kurtán, T., Pescitelli, G., Salvadori, P., Kenéz, Á., Antus, S., Szilágyi, L., Illyés, T.-Z., Szabó, I.: Circular Dichroism of Diglycosyl Dichalcogenides in Solution and Solid State. *Chirality*. 20, 379-385 (2008); c) Kurtán, T., Borbás, A., Szabó, Z. B., Lipták, A., Bényei, A., Antus, S.: Circular Dichroism of 1,3-Dioxane-Type (2'-Naphthyl) methylene Acetals of Glycosides. *Chirality*. 16, 244-250 (2004); d) Kerti, G., Kurtán, T., Borbás, A., Szabó, Z. B., Lipták, A., Szilágyi, L., Illyés, T.-Z., Bényei, A., Antus, S., Watanabe, M., Castiglioni, E., Pescitelli, G., Salvadori, P.: Synthesis and Chiroptical Properties of (Naphthyl) ethylidene Ketals of Carbohydrates in Solution and Solid State. *Tetrahedron*. 64, 1676-1688 (2008); e) Ósz, K., Bóka, B., Várnagy, K., Sóvágó, I., Kurtán, T., Antus, S.: The application of circular dichroism spectroscopy for the determination of metal ion speciation and coordination modes of peptide complexes. *Polyhedron*. 21, 2149-2159 (2002); f) Pintér, G., Batta, Gy., Horváth, I., Lőki, I., Kurtán, T., Antus, S., Kéki, S., Zsuga, M., Nagy, G., Aradi, J., Gunda, T., Herczegh, P.: Supramolecular Polymers Based on the Quadruplex Formation of Dipeptide Guanosine Macromonomers in Nonaqueous Media. *Langmuir*. 23, 5283-5285 (2007); g) Király, R., Csósz, E., Kurtán, T., Szigeti, K., Fésüs, L.: Identification of the strong Ca(II)-binding site of human transaminase 2. *FEBS Journal*. 276, 145 (2009); h) Király, R., Csósz, E., Kurtán, T., Antus, S., Szigeti, K., Simon-Véscsei, Zs., Komppai-Szabó, I.R., Fésüs, L.: Functional significance of five noncanonical Ca(II)-binding sites of human transaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. *FEBS Journal*. 276, 7083-7096 (2009).
 48. Kerti, G., Kurtán, T., Illyés, T.-Z., Kövér, K.E., Sólyom, S., Pescitelli, G., Fujioka, N., Berova, N., Antus, S.: Enantioselective Synthesis of 3-Methylisochromans and Determination of Their Absolute Configuration by Circular Dichroism. *Eur. J. Org. Chem.* 296-305 (2007).
 49. Kock, I., Dräeger, S., Schulz, B., Elsässer, B., Kurtán, T., Kenéz, Á., Antus, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Speakman, J.-P., Rheinheimer, J., Krohn, K.: Pseudoanguliosporin A and B: Two Isochromanes Isolated from the Endophytic Fungus *Pseudoanguliospora*. *Eur. J. Org. Chem.* 1427-1434 (2009).
 50. a) Elsässer, B., Krohn, K., Flörke, U., Root, N., Aust, H.-J., Dräger, S., Schulz, B., Antus, S., Kurtán, T.: X-ray Structure Determination, Absolute Configuration and Biological Activity of Phomoxanthone A. *Eur. J. Org. Chem.* 4563-4570 (2005); b) Hussain, H., Krohn, K., Flörke, U., Schulz, B., Dräeger, S., Pescitelli, G., Antus, S., Kurtán, T.: Absolute Configuration of Globosuxanthone A and Secondary Metabolites from *Microdiplodia* sp. – A Novel Solid-State CD/TDDFT Approach. *Eur. J. Org. Chem.*, 292-295 (2007); c) Krohn, K., Kock, I., Elsässer, B., Flörke, U., Schulz, B., Dräeger, S., Pescitelli, G., Antus, S., Kurtán, T.: Bioactive Natural Products from the Endophytic Fungus *Ascochyta* sp. from *Melilotus dentatus* – Configurational Assignment by Solid-State CD and TDDFT Calculations. *Eur. J. Org. Chem.*, 1123-1129 (2007); d) Krohn, K., Farooq, U., Flörke, U., Schulz, B., Dräeger, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Antus, S., Kurtán, T.: Secondary Metabolites Isolated from an Endophytic *Phoma* sp. Absolute Configuration of Tetrahydropyrenophorol Using the Solid-State TDDFT CD Methodology. *Eur. J. Org. Chem.* 3206-3211 (2007); e) Krohn, K., Ullak, Z., Hussain, H., Flörke, U., Schulz, B., Dräeger, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Antus, S., Kurtán, T.: Massari-lactones E-G, New Metabolites from the Endophytic Fungus *Coniothyrium* sp., Associated with the Plant *Artemisia maritima*. *Chirality*, 19, 464-470 (2007); f) Dai, J., Krohn, K., Elsässer, B., Flörke, U., Dräeger, S., Schulz, B., Pescitelli, G., Salvadori, P., Antus, S., Kurtán, T.: Metabolic Products of the Endophytic Fungus *Microsphaeropsis* sp. from *Larix decidua*. *Eur. J. Org. Chem.* 4845-4854 (2007); g) Hussain, H., Krohn, K., Flörke, U., Schulz, B., Dräeger, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Antus, S., Kurtán, T.: Absolute configuration of hypothemycin and 5'-O-

- methylhypothemycin from *Phoma* sp.-a test case for solid state CD/TDDFT approach. *Tetrahedron-Asymmetr.* 18, 925-930 (2007); h) Zhang, W., Krohn, K., Ullah, Z., Flörke, U., Pescitelli, G., Di Bari, L., Antus, S., Kurtán, T., Rheinheimer, J., Dräeger, S., Schulz, B.: New Mono- and Dimeric Members of the Secalonic Acid Family: Blennolides A–G Isolated from the Fungus *Blennoria* sp. *Chem-Eur. J.* 14(16), 4913-4923 (2008). i) Qin, S., Krohn, K., Flörke, U., Schulz, B., Dräeger, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Antus, S., Kurtán, T.: Two New Fusidilactones from the Fungal Endophyte *Fusidium* sp. *Eur. J. Org. Chem.* 3279-3284 (2009). j) Guo, Y-W., Kurtán, T., Krohn, K., Pescitelli, G., Zhang, W.: Assignment of Absolute Configuration of Zwitterionic and Neutral Macropodumines by Means of TDDFT CD Calculations. *Chirality* 21, 561-568 (2009).
51. Kónya, K., Kurtán, T., Kiss-Szikszai, A., Juhász, L., Antus, S.: A general CD-method for the configurational assignment of erythro-8,4'-oxyneolig.8'-enes. *Arcivoc* 12, 72-78 (2004).
 52. Ferrari, J., Terreaux, Ch., Kurtán, T., Szikszai-Kiss, A., Antus, S., Msonthi, J.D., Hostettmann, K.: Isolation and On-Line LC/CD Analysis of 3,8''-Linked Biflavonoids from *Gnidia involucrata*. *Helv. Chim. Acta.* 86, 2768-2778 (2003).
 53. Yao, S., Tang, C.P., Ye, Y., Kurtán, T., Kiss-Szikszai, A., Antus, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Krohn, K.: Stereochemistry of atropisomeric 9,10-dihydrophenanthrene dimers from *Pholidota chinensis*. *Tetrahedron-Asymmetry* 19, 2007-2014 (2008).
 54. Szilágyi, L.; Pusztahelyi, Z.S.; Jakab, S.; Kovács, I.: Microscopic protonation constants in tobramycin. An NMR and pH study with the aid of partially N-acetylated derivatives. *Carbohydr. Res.* 247, 99-109 (1993); c) Szilágyi, L.; Forgó, P.: Determination of proton-proton distances in 2-acetamido-2-deoxymonosaccharides from ^1H NMR relaxation measurements in solution. *Carbohydr. Res.* 247, 129-144 (1993).
 55. Szilágyi, L., Pusztahelyi, Z.: Apramycin: Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments and study of the solution conformation by ROESY measurements. *Magn. Reson. Chem.* 30, 107-117 (1992).
 56. Christofides, J.C., Davies, D.B., Martin, J.A., Rathbone, E.B.: Intramolecular hydrogen bonding in 1'-sucrose derivatives determined by SIMPLE proton NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5738-5743 (1986).
 57. Szilágyi, L., Sándor, P.: Complete assignments of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of the macrolide antibiotic flavofungin; intramolecular hydrogen bonding and conformation. *Magn. Reson. Chem.* 28, 963-972 (1990).
 58. a) Szilágyi, L., Samu, J., Harsányi, I.: Structure elucidation of two acetylated derivatives of oligomycin-A. *Spectr. Lett.* 28, 699-709 (1995); b) Szilágyi, L.; Fehér, K.: Oligomycins B and C: complete ab initio assignments of their ^1H and ^{13}C NMR spectra and a study of their conformations in solution. *J. Mol. Struct.* 471, 195-207 (1998).
 59. Szilágyi, L., Makleit, S., Hosztafi, S., Simon, C.: Substituent-dependent conformational changes in 6-substituted Codeine Derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 30, 552-557 (1992).
 60. El-Joubary, A., Bruix, M., Santoro, J., Cafaro, V., Scognamiglio, R., Di Donato, A., D'Alessio, G., Kövér, K.E., Batta, Gy., Szilágyi, L., Rico, M.: ^1H and ^{15}N sequential assignment and solution secondary structure of ^{15}N labelled human pancreatic ribonuclease. *J. Biomol. NMR.* 15, 265-266 (1999).
 61. a) Szilágyi, L., Herczegh, P., Bujtás, G.: A convenient route to N-acetyl-D-glucosamine-2-C-d and N-acetyl-D-mannosamine-2-C-d. *Z. Naturforsch.* 32b, 296-298 (1977); b) Szilágyi, L.; Forgó, P.: Enzyme-inhibitor complexes of lysozyme with glucosamine inhibitors. A molecular dynamics study through ^2H NMR. *Biophys. Chem.* 40, 89-96 (1991).
 62. Antus, S.: Biológiai aktív vegyületek kutatása a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén 1992-2009 között, III. rész. *Acta Pharm. Hung.* 80, 3-17 (2009).
 63. a) Ósz, E., Szilágyi, L., Somsák, L., Bényei, A.: Syntheses of Novel Glycosylidene-Spiro Heterocycles Related to Hydrantocidin. *Tetrahedron.* 55, 2419-2430 (1999); b) Ósz, E., Szilágyi, L., Marton, J.: Structural analysis of hydantoins and 2-thiohydantoins in solution using ^{13}C , ^1H NMR coupling constants. *J. Mol. Struct.* 442, 267-274 (1998) / Erratum: *J. Mol. Struct.* 475, 295 (1999).
 64. a) Kövér, K.E., Fehér, K., Szilágyi, L., Borbás, A., Herczegh, P., Lipták, A.: 2D NMR spectra of oligosaccharides enhanced by band-selective suppression of unwanted signals. *Tetrahedron Lett.* 41, 393-396 (2000); b) Szilágyi, L.: NMR a szénhidrátkémiaiában. *Magy. Kém. Foly.* 109-110, 136-142 (2004).
 65. a) Szilágyi, L., Illyés, T.-Z., Györgydeák, Z., Szabó, Gy., Karácsony, A.: Syntheses of partially hydrogenated [1,2,4] triazolo[4,5-a]pyrimidine-4-ones through cyclisation of 2-arylidenehydrazino-6-methyl-4-pyrimidones. *Arkivoc.* 7, 243-252 (2004); b) Illyés, T.Z., Molnár-Gábor, D., Szilágyi, L.: Novel approaches to the syntheses of N-substituted S-glycosyl Sulfenamides. *Carbohydr. Res.* 339, 1561-1564 (2004).
 66. Májer, G., Borbás, A., Illyés, T.Z., Szilágyi, L., Bényei, A., Lipták, A.: Synthesis of ketopyranosyl glycosides and determination of their anomeric configuration on the basis of the three-bond carbon-proton couplings. *Carbohydr. Res.* 342, 1393-1404 (2007).
 67. a) Szilágyi, L., Illyés, T.Z., Herczegh, P.: Elaboration of a novel type of interglycosidic linkage: syntheses of disulfide disaccharides. *Tetrahedron Lett.* 42, 3901-3903 (2001); b) Brito, I., López-Rodríguez, M., Bényei, A., Szilágyi, L.: Crystal and molecular structures of diglycosyl disulfide derivatives. *Carbohydr. Res.* 341, 2967-2972 (2006).
 68. a) Matter, H., Szilágyi, L., Forgó, P., Marinic, Z., Klaić, B.: Structure and dynamics of a peptidoglycan monomer in aqueous solution using NMR spectroscopy and simulated annealing calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 2212-2223 (1997); b) Fehér, K., Pristovšek, P., Szilágyi, L., Ljevaković, D., Tomašić, J.: Modified glycopeptides related to cell wall peptidoglycan: conformational studies by NMR and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 3133-3140 (2003).
 69. a) Pristovšek, P., Fehér, K., Szilágyi, L., Kidrič, J.: Structure of a synthetic fragment of the LALF protein when bound to lipopolysaccharide. *J. Med. Chem.* 48, 1666-1670 (2005); b) Jackson, G.E., Mabula, A.N., Stone, S.R., Gäde, G., Kövér, K.E., Szilágyi, L., van der Spoel, D.: Solution Conformations of an Insect Neuropeptide: Crustacean Cardioactive Peptide (CCAP). *Peptides.* 30, 557-564 (2009).
 70. Murthy, B.N., Sinha, S., Surolia, A., Jayaraman, N., Szilágyi, L., Szabó, I., Kövér, K.E.: Interactions of Aromatic Mannosyl Disulfide Derivatives with Concanavalin A. Synthesis, Thermodynamic and NMR studies. *Carbohydr. Res.* 344, 1758-1763 (2009).
 71. a) Beck, M.T., Kéki, S., Dinya, Z.: Oscillatory Kinetics of the Carbonization Reaction of Toluene Upon the Effect of Electric Discharges. *Fullerene Sci. and Technology.* 1, 111-119 (1993); b) Beck, M.T., Dinya, Z., Dombi, A., Fetzner, J.C., Kéki, S., Papp, L., Szabó, P., Szépvölgyi, J.,

- Zsuga, M.: Fullerenes. In the Electrochemical Soc.Inc. (Ed by Kadish, M.K. and Ruoff, R.S.) pp 80-91 (1994).
72. a) Dinya, Z., Litkei, Gy., Lipták, M., Szabó, P.: GC/MS and LC/MS studies of the extracts of natural products. *Gyógyszerészet*, 71-72 (1992); b) Dinya, Z., Litkei, Gy., Jekő, J., Varró, K., Antus, S.: GC-LC-MS Studies of the Extracts of Buds of *Populus nigra*. In: *Flavonoids and Bioflavonoids* (Ed. by Antus, S., Gábor, M., and Vetschera, K.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 255-265 (1996).
73. a) Kovács, Zs., Dinya, Z.: Examinations of non-volatile organic compounds in red wine made in Eger. *Microchem. J.* 67, 57-62 (2000); b) Kovács, Z., Dinya, Z., Antus, S.: LC-SSI-MS Techniques as Efficient Tools for Characterization of Non-volatile Phenolic Compounds of a Special Hungarian Wine. *J. Chrom. Sci.* 43, 125-129 (2004).
74. a) Tóth, E., Dinya, Z., Szilágyi, L., Antus, S.: Synthesis of Deuterium Labeled Pterocarpans. *Het. Comm.* 7, 257-262 (2001); b) Tóth, E., Dinya, Z., Antus, S.: Mass Spectrometry Studies of Pterocarpin Skeleton. *Rapid Comm. in Mass Spectrometry*. 14, 2367-2372 (2007).
75. Dinya, Z., Lipták, M., Szabó, P., Sztaricskai, F.: Determination of Active Hydrogen in Organic Compounds by Electron. *Impact Mass Spectrometry*. *Rapid Comm. in Mass Spectrometry*. 6, 679-683 (1992).
76. Vékey, K., Szabó, P., Dinya, Z.: Doubly Charged Ions: Differentiation of Flavanone and 2'-Hydroxy Chalcone. *Rapid Comm. in Mass Spectrometry*. 7, 635-640 (1993).
77. a) Szabó, P.T., Pócsfalvi, G., Györgydeák, Z., Somogyi, A., Dinya, Z.: Electron impact mass spectrometry of 2-aryl-thiazolidine-4-carboxylic acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10, 1136-1140 (1996); b) Ferenczi, R., Kurtán, T., Dinya, Z., Antus, S.: Synthesis of Deuterium Labeled Silybin and Isosilybin. *Het. Comm.* 11, 491-494 (2005); c) Kéki, S., Tóth, K., Zsuga, M., Ferenczi, R., Antus, S.: (+)-Silybin, a pharmacologically active constituent of *Silybum marianum*: fragmentation studies by atmospheric pressure chemical ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Comm. in Mass Spectrometry*, 21, 2255-2262 (2007).
78. Uri, J., Bognár, R., Békési, I., Varga, B.: Desertomycin a new crystalline antibiotic with antibacterial and cytostatic action. *Nature*. 31, 401(1958).
79. Dinya, Z., Sztaricskai, F., Horváth, E., Schaág, J.B., Varró, K.: Studies of the Components of Crude Desertomycin Complex by Means of Electrospray and Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Techniques. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1439-1448 (1996).
80. Dinya, Z., Benke, P., Györgydeák, Z., Somsák, L., Jekő, J., Pintér, P., Kuszmann, J., Praly, J-L.: Mass Spectrometric Studies of the Anomeric Glycopyranosyl Azides. *J. Mass Spectrometry*. 36, 211-219 (2001).
81. a) Hallgas, B., Patonay, T., Kiss-Szikszai, A., Dobos, Zs., Hollósy, F., Erős, D., Örfi, L., Kéri, Gy., Idei, M.: Comparison of measured and calculated lipophilicity of substituted and related compounds. *J. Chrom.* 801, 229-235 (2004); b) Huszár, M., Hallgas, B., Idei, M., Kiss-Szikszai, A., Horváth, A., Patonay, T.: Lipophilicity of Substituted Aurones and Related Compounds Measured on Immobilized Artificial Membrane (IAM) and Conventional C8 (MOS) Columns. *J. Liquid Chrom. & Rel. Techn.* 31, 3143-3158 (2008).

[Érkezett: 2010. október 25.]

P21-aktivált kináz gátlók vizsgálata „in silico” módszerek felhasználásával

BASKA FERENC^{1,2}, SZÁNTAI-KIS CSABA², GREFF ZOLTÁN², MAROSFALVI JENŐ²,
VARGA ZOLTÁN², KÉRI GYÖRGY^{1,2,3}, ÓRFI LÁSZLÓ^{1,2,4}

¹Racionális Hatóanyagtervező Laboratórium, Kooperációs Kutató Központ, Semmelweis Egyetem, 1085, Budapest, Üllői út 16.;

²Vichem Chemie Kft., Budapest, Herman O. u. 15. – 1022;

³MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, Tűzoltó u. 37-47. 1094;

⁴Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest, Hőgyes E. u. 9. – 1092;

Levelezési cím: e-mail: orlasz@gytk.sote.hu

Summary

Baska, F., Szántai-Kis, Cs., Greff, Z., Marosfalvi, J., Varga, Z., Kéri, Gy., Órfi, L.: *Development of PAK1 kinase inhibitors with „in silico” modeling methods*

The important role of several protein kinases in many diseases has been well documented. Nowadays they are known as an important class of drug targets. The similarity of the structures of the protein kinases makes the development of selective inhibitors difficult. Only a few selective PAK1 kinase inhibitors have been published in the literature, so we have applied „in silico” methods to aid the development of further selective PAK1 inhibitors. The effects of the potential inhibitors were screened in biochemical assays and pharmacological features have been determined for further development

Keywords: PAK1 kinase, Schrödinger Suite, molecular modeling, kinase assay

Összefoglalás

A jelátviteli mechanizmusokban kulcsszerepet játszó kinázokat sok betegség validált biológiai célmolekuláiként tartják számon. A kinázgátló vegyületek fejlesztése így egyre nagyobb részt foglal el a gyógyszerkutatásban. A kinázfehérjék szerkezeti hasonlósága megnehezíti a szelektív inhibitorok előállítását és kifejlesztését. A PAK1 kináz kóros aktivitása több betegségben is kimutatható, de egyelőre viszonylag kevés gátló vegyület szerepel a releváns szakirodalomban. Közleményünkben egy általunk előnyösnek talált „in silico” módszer alkalmazását mutatjuk be. A potenciális inhibitorok hatását biokémiai vizsgálattal validáltuk és a későbbi fejlesztés céljából predikáltuk gyógyszerkémiai tulajdonságaikat.

Kulcsszavak: PAK1, Schrödinger Suite, molekulamodellezés, kináz assay

Bevezetés

A kinázok olyan fehérjék, melyek kiemelkedő szerepet töltenek be a sejten belüli jelátviteli folyamatokban és kóros aktiválódásuk több betegség (daganatok, bakteriális és vírusos fertőzések, gyulladások) kialakulásának hátterében állhat [1]. Jelenleg 518 kináz ismert és 244 kinázról mutatták ki, hogy patológiás jelentősége van, többségüknek sikerült bizonyítani daganatos megbetegedésekben betöltött szerepét is [2]. Egyike ezeknek a p21-aktivált kinázok közé tartozó PAK1 kináz is. A PAK1 – melyet először agyszövetből sikerült klónozni és kimutatni – túlműködése leginkább mellkasi, de petefészek és gyomor tumorokban is detektálható [3-4].

A p21-aktivált kinázok (PAK) a szerin-treonin protein kinázok közé tartoznak. Részt vesznek a fehérjetranszkripcióban, a citoskeletális változá-

sok szabályozásában, valamint az apoptózis indukciójában [5-6]. Jelenleg hat típusa ismert: PAK1, PAK2, PAK3, PAK4, PAK5 és PAK6. Aktiválódási módjuk szerint a hat típus két csoportra osztható. Az első csoportba a PAK1-3, illetve a kettes csoportba a PAK4-6 fehérje tartozik. A PAK1-3 enzimek aktivációjáért az Rho p21 fehérjecsaldába tartozó kisméretű GTPáz fehérjék (Cdc42, Rac) a felelősek, míg a PAK4-6 enzimek más úton aktiválódnak [7-11].

Vegyületek „in silico” szűrésével lényegesen le-rövidíthető a hatékony molekulák előállításának és tesztelésének az ideje. A legmodernebb kötődés- és kölcsönhatás modellező programok pontossága a fejlesztéseknek köszönhetően napjainkban már meghaladta a 80%-ot. A megbízhatóság terén az élen jár a Schrödinger LLC. által kifejlesztett Schrödinger Suite programcsomag, mely sikeresen alkalmazható a legkülönbözőbb receptor-

ligand kötődések, ADME paraméterek, QSAR modellek és kötőhelyek felderítésének becslésére [12-14].

Mivel a PAK1 fehérje számos daganat okozója lehet és a releváns szakirodalomban viszonylag kevés szelektív gátló szer ismeretes, kinázgátló vegyülettárunk nagyhatékonyságú szűrését végeztük el új inhibitorok fejlesztése céljából. A talált inhibitor hatású („hit”) molekulák kötődését modelleztük, ADME paramétereit meghatároztuk és gátló hatásukat *in vitro* biokémiai assay-ben megmértük.

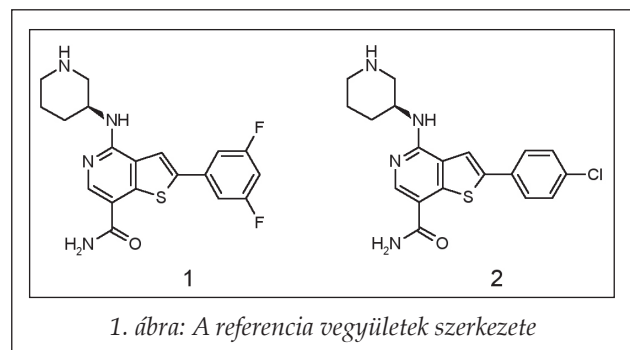
Anyagok és módszerek

A kötődés modellezését és a szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatát a Schrödinger Suite 2009 és 2010 [14] programcsomaggal végeztük. Felhasznált modulok: Glide, LigPrep, Maestro, Prime, QikProp, SiteMap.

A dokkoláshoz a PAK1 fehérje kokrisztallizációval meghatározott 3D szerkezetét használtuk (Protein Databank ID: 2HY8). A nyers szerkezetet a Protein Preparation varázslóval alkalmassá tettük a dokkolásra: a kristályszerkezetben megjelenítettük a hidrogéneket, töröltük a vízmolekulákat és optimalizáltuk a fehérje szerkezeten belüli inter- és intramolekuláris hidrogén-híd kötésekét. Ezt követően a Glide modullal megszerkesztettük az úgynevezett „Grid”-et, mely a kötőhely 3 dimenziós modelljét tartalmazza. Ebbe a modellbe dokkoltuk a vegyületeket. Validálás céljából a kokrisztallizált szerkezetben lévő kismolekulájú gátlószert a programmal újradokkoltuk.

A vegyületeink 3 dimenziós szerkezetét szöveti pH-n a LigPrep modullal határoztuk meg. A logP, valamint ADME paraméterek kalkulációját a QikProp modullal végeztük. A modellezések során mindvégig a legprecízebb beállításokkal (XP mode) dolgoztunk.

Az *in vitro* kináz assay beállításához két, az irodalomban ismert PAK1 gátló referencia anyagot [15] (1. ábra) szintetizáltunk (1, 2).



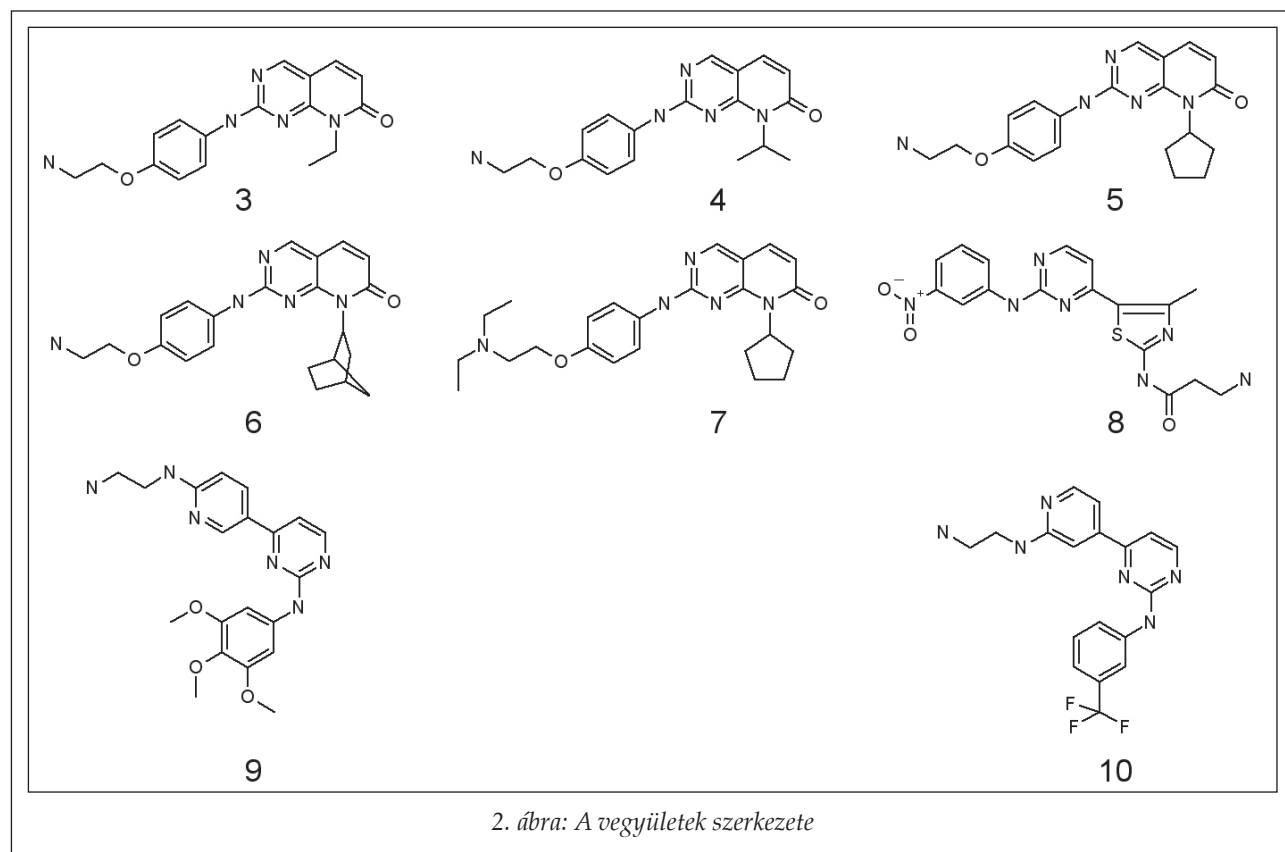
Az assay-t az alábbi módon állítottuk be a PAK1 enzim assay-t 384 lyukú mikrolemezen (Corning 3676) 8 μ l térfogatban végeztük el. A felhasznált assay puffer: 20 mM HEPES (4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav) 7,5-ös pH-jú oldata, 1 mM DTT (ditiotritol), 0,4 mM $MgCl_2$ és 0,01 térfogatszázalékos Tween20 detergens. Az assay-ben a PAK1 koncentrációját úgy állítottuk be, hogy a szubsztrát átalakulás 50%-os legyen. Szubsztrátként karboxi-fluoreszceinnel jelölt PAK1 enzim specifikus peptidet használtunk (400 nM) az ATP mellett. Az ATP koncentrációját a lát-szólagos $K_{m_{ATP}}$ értéknek megfelelően állítottuk be (75 μ M). Az enzimreakciót 60 percig inkubáltuk, majd 15 μ l IMAP detektáló oldatot adtunk hozzá. Összetétel: 75 térfogatszázalék „IMAP Binding Buffer A”, 25 térfogatszázalék „IMAP Binding Buffer B” és 1/800 „IMAP Binding reagent”. A detektáló reagenssel szintén 60 percig inkubáltuk, majd Analyst GT készüléken mértük a fluoreszcencia polarizációt. Három párhuzamos mérést végeztünk.

Eredmények

Virtuális szűrés – modellezés

A nagyhatékonyságú szűrés során a 2. ábrán bemutatott vegyületek kaptak kimagasló – a referencia vegyületeknél is jobb – score értékeket:

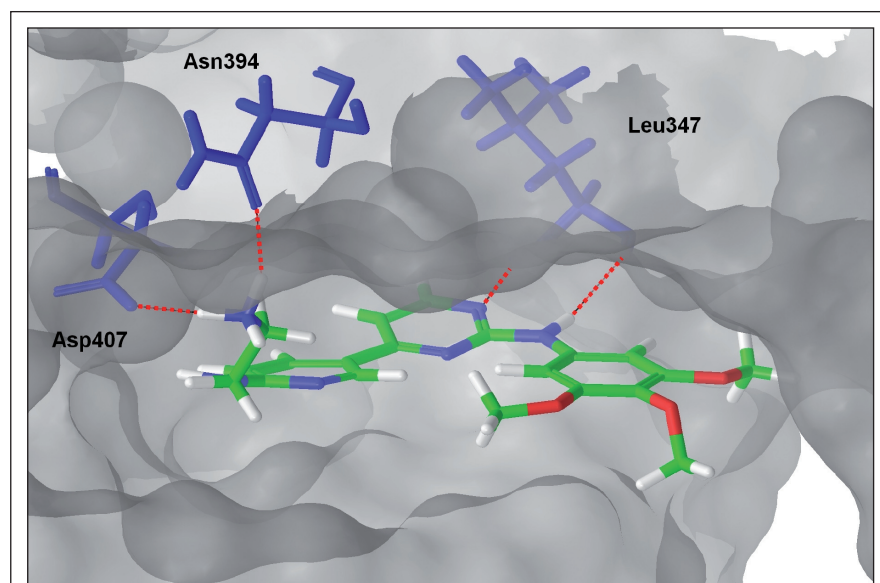
A közös kötődési pontokat keresve megállapítottuk, hogy kulcsfontosságú farmakofór pont a pirimidin gyűrűhöz közvetlenül kapcsolódó amino csoport, mely hidrogén donorként viselkedik és kötést létesít a receptor aminosavszekvencia szerinti 347-es leucin (Leu³⁴⁷) oxigénjével. Szintén a Leu³⁴⁷-el lép kölcsönhatásba a pirimidin gyűrű nitrogénje, mint akceptor, mert ebben az esetben a leucin amino csoportja viselkedik donorként. A vegyületek oldhatóságának javulását szolgálják az aminocsoportokat tartalmazó oldalláncok. Ez a fehérjéhez való kötődés szempontjából is előnyös, mert az oldalláncban lévő primer- és terciér aminocsoportok egy- illetve két hidrogénhíd kötés kialakításában vehetnek részt. Fontos megjegyezni, hogy szöveti pH-n a terciér aminocsoport is protonált, így donorként viselkedik. A 2. ábrán látható első öt vegyület (3-7) a 354-es aszparaginsav (Asp³⁵⁴) oxigénjével létesít hidrogénhíd kötést az oldallánc aminocsoportján keresztül. A 8-as számú vegyület primer aminocsoportja a 407-es aszparaginsav (Asp⁴⁰⁷) oxigénjével, míg a 9-es és 10-es vegyület aminocsoportja két aminosav – az Asp⁴⁰⁷ és a 394-es asz-



paragin (Asn³⁹⁴) – oxigénjével lép kölcsönhatásba. További esszenciális farmakofór pont az aromás gyűrű helyzete. Az összes vegyület tartalmaz egy aromás gyűrű – szekunder amin – aromás gyűrű rendszert. Megvizsgálva a vegyületek dokkolt konformációját jól látható, hogy ez a három farmakofór pont térben átfed egymással.

A szerkezet-hatás összefüggések vizsgálat során azt a következtetést vontuk le, hogy a kötődés létrejöttéhez esszenciális a fenilamino-pirimidin csoport megléte, illetve a poláris oldallánc egyéb kölcsönhatások kialakítására képes a receptoron.

A legjobb hatásúnak mért vegyület kötődési modelljét a 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A 9-es számú vegyület kötődése a PAK1 fehérjéhez. A kialakult hidrogénhíd kötéseket piros pontozott vonallal jelöltük.

A kináz assay-ben mért IC₅₀ értékeket, a docking score-t és az ADME tulajdonságok kalkulációjának eredményeit az I. táblázatban foglaltuk össze.

A docking score érték a vegyület kötőhely iránti becslött affinitását adja meg. Minél kisebb ez az érték, annál jobb a kötődés. Jól látható, hogy a referenciavegyületek (1, 2) score értéke nagyobb, mint a vegyületeinké, ezért a modell alapján azt vártuk, hogy biológiai hatásban is megmutatkozik ez a különbség. Bár a score érték nem mindig korrelál a biológiai mérések eredményeivel, az IC₅₀ mérések megerősítették, hogy a vegyületeink közel

I. táblázat

Eredmények: a kináz assay eredményei (első oszlop), a Glide által becsült kötődési affinitás (második oszlop) és a becsült ADME paraméterek(*)

Vegyület	PAK1 IC ₅₀ (μM)	Docking score	Molekulatömeg (g/mol)	logP*	Felszívódás orális alkalmazás esetén (%)*	Humán szérum albumin kötődés (log K _{hsa})*
1	4,038	-8,62	388,434	2,732	80	0,297
2	1,127	-10,446	386,898	2,746	80	0,324
3	4,255	-13,125	325,369	1,626	75	-0,201
4	3,572	-12,647	339,396	1,996	78	-0,082
5	2,533	-13,537	365,434	2,418	81	0,114
6	1,415	-13,288	391,472	2,751	84	0,245
7	2,851	-12,141	421,541	4,093	100	0,45
8	0,981	-12,087	399,426	1,517	53	0,059
9	0,652	-12,15	396,448	2,538	80	0,053
10	4,208	-12,47	374,368	3,283	87	0,199

olyan hatásosak, illetve két esetben (8, 9) jobbakként, mint a referenciaanyagok. Az 1-es számú referenciavegyület mind score értékben, mind IC₅₀ értékben elmarad a többi vegyülettől.

Néhány ADME paraméter kalkulációjával a vegyületek gyógyszeryszerűségét kívántuk megbecsülni. A megoszlási hányados (logP) érték ismerete kiemelten fontos a gyógyszer-molekulák fejlesztése során, mert leginkább megszabja a molekula szerkezeten belüli sorsát mind farmakokinetikai, mind farmakodinámiai szempontból. A QikProp modullal végeztük a kalkulációt, a vegyületek nem ionizált formáját felhasználva. Két kivételtől eltekintve (7, 10) a vegyületek lipofilitása 3 alatt volt, ez elég jó értéknek mondható a Lipinski szabályban meghatározotthoz (logP < 5) képest. A két referenciavegyülethez képest valamelyest javult az oldhatóság, ez betudható a poláris csoportot tartalmazó oldalláncok jelenlétének. Az orális alkalmazás esetén történő felszívódás százalékos prediktálása a 8-as számú vegyület esetén 53 százalékos, míg a többi vegyületnél 70 százalék feletti felszívódást mutatott.

A szerkezetben található fehérjékhez való kötődés nagymértékben befolyásolhatja a gyógyszerhatást. Ennek becslésére a humán szérumalbuminhoz való kötődést néztük (I. táblázat), szintén a QikProp modul segítségével. Minél kisebb a log K_{hsa} érték, annál kisebb mértékben kötődik a vegyület a fehérjéhez. A 3-as és 4-es vegyület esetén csekély humán szérumalbumin-inhibitor komplex kialakulására kell számítani, de a többi vegyület is kisebb mértékben képez komplexet a fehérjével, mint a referencia anyagok.

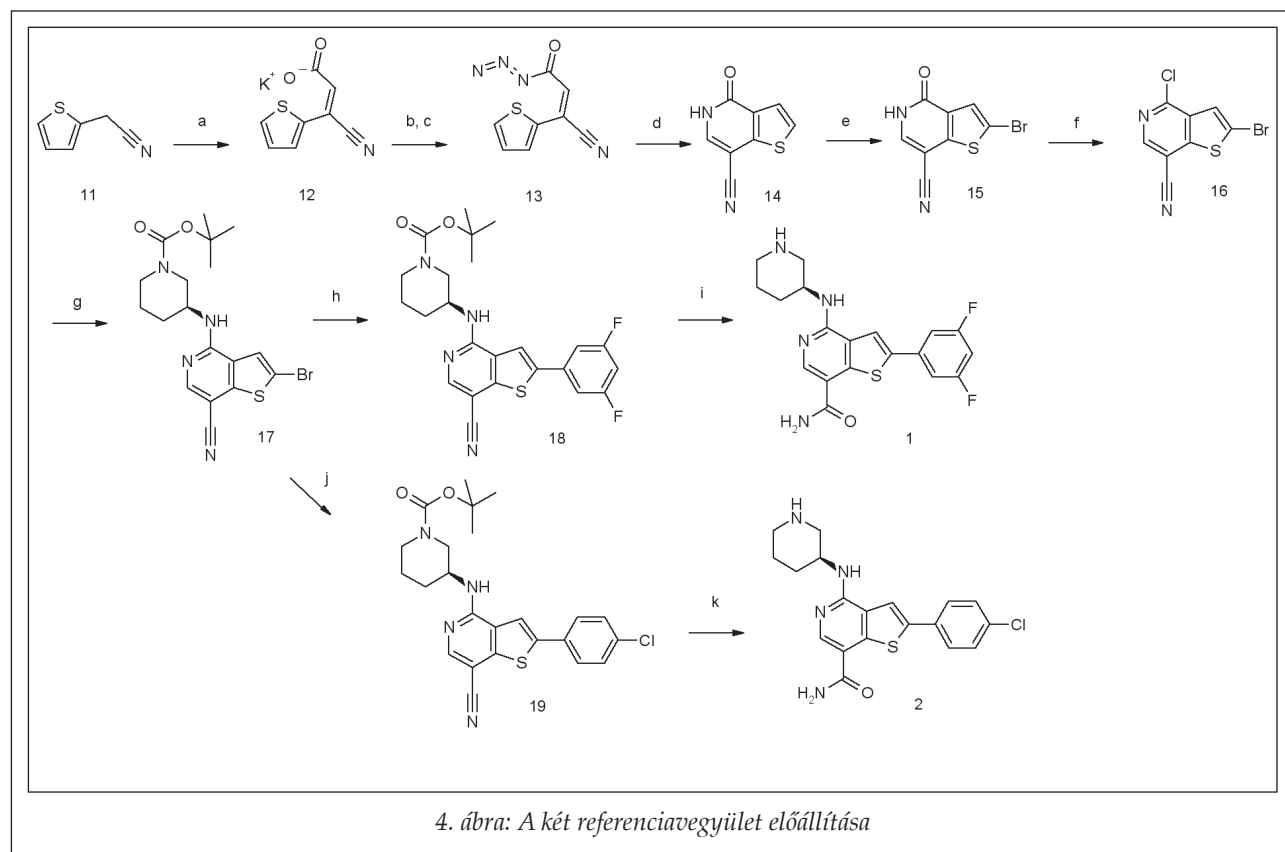
Összefoglalás

Összefoglalva a fentieket elmondhatjuk, hogy az „*in silico*” szűrés során találtunk nyolc potenciális PAK1 kinázgátló vegyületet. A kötődésüket modelleztük és farmakofór pontok meghatározásával megjelöltük az esszenciális funkciók csoportokat, valamint molekularészeket. A Schrödinger modulok által kalkulált hatást sikerült *in vitro* assay módszerrel is igazolni és a vegyületek bizonyos fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságainak számolásával gyógyszeryszerűségüket prediktálni.

Referencia anyagok szintézise

Általános megjegyzések

A szintézishez felhasznált vegyületeket a Sigma-Aldrich Kft.-től, valamint az Apollo Scientific Ltd.-től vásároltuk. Az NMR spektrumokat BRUKER AC 300 (1H frekvencia 300,13 MHz) készülékkel vettük fel deuterált dimetil-szulfoxid oldószerben. A kémiai eltolódásokat parts per million-ban (δ) adtuk meg a TMS-hez (δ = 0,00 ppm) viszonyítva. Az electrospray ionizációs tömeg spektrumok egy Waters 2795 HPLC és Waters 996 fotodiódasoros detektorral kapcsolt Micromass ZMD 2000 LC-MS rendszeren készültek, melyet a tisztaság meghatározására is használtunk. Kezdeti eluens összetétel: A 100% víz, 0,05% hangyasav; B 100% acetonitril, 0,05% hangyasav. Gradiens elúció mellett Waters XBridge C18 oszlopot alkalmaztunk, az eluensösszetétel az alábbiak szerint alakult: 30 má-



sodpercig 5% B eluens, 6 percig 95% B eluens, 7 percig 5% B eluens. Áramlási sebesség: 2 ml/perc. Injektálás 5 μ g. A sorszámozott vegyületek elnevezése az ACD Labs 9 szoftver segítségével történt.

3-Ciano-3-(2-tenil)-akrilsav kálium só (12) előállítása (4. ábra a):

A kiindulási 2-tiofénacetonitrilt (11) (10 g, 81 mmól) vízmentes metanolban (120 ml) feloldottuk, majd glioxálsav monohidrátot (745 g, 81 mmól) és kálium-karbonátot (10,26 g, 74,2 mmól) adtunk a rendszerhez. Argon alatt kevertettük reflux hőmérsékleten. Két és fél óra után fehér csapadékkiválás volt tapasztalható. A kivált anyagot kiszűr-tük, majd vízmentes metanollal mostuk és vákuum alatt szárítottuk. Kitermelés: 16,011 g (90%).

$^1\text{H-NMR}$ 300 MHz (DMSO- D_6): δ 12.9 (bs, 1H); 7.52 (6 Hz, d, 1H); 7.39 (9 Hz, d, 1H); 7.22 (9 Hz, t, 1H); 6.8 (s, 1H)

HPLC-MS R_t = 2,8 perc

Tisztaság: 93%

(ES): m/z = 180 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 178 $[\text{M}-\text{H}]^-$

3-Ciano-3-(2-tenil)-akrilsav-azid (13) előállítása (4. ábra b, c):

A kiindulási vegyületet (12) (6,913 g, 31,82 mmól) diklór-metánnal (70 ml) elszuszpendáltuk, majd

lassan hozzáadtuk az oxalil-klorid (8,2 ml, 95 mmól) diklór-metános (30 ml) elegyéhez. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük 1-2 órát, majd az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottuk. Az így kapott citromsárga terméket (9,23 g, 46 mmól) dioxánban (45 ml) feloldottuk. A nátrium-azidot (9,23 g, 142 mmól) elszuszpendáltuk a dioxán-víz 1:1 arányú elegyében (100 ml) és 0 $^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük. Ehhez a szuszpenzióhoz lassan hozzáadtuk a korábban előállított savklorid dioxános oldatát. 30 percig kevertettük 0 $^{\circ}\text{C}$ -on a reakcióelegyet, majd felengedték szobahőmérsékletre és további 2 órát kevertettük. Az oldatot desztillált vízre (~500 ml) öntöttük és a kiváló világosbarna anyagot szűrtük és vákuum alatt szárítottuk. Termelés: 4,21 g (30% a savkloridhoz képest).

HPLC-MS R_t = Az anyagot bomlékonysága miatt nem mértük.

7-Ciano-4,5-dihidro-4-oxo-tieno[3,2-c]piridin (14) előállítása (4. ábra d):

Difenil-éter (100 g) és tributil-amin (14,72 ml, 61,8 mmól) elegyét argon alatt 210 $^{\circ}\text{C}$ -ra melegítettük. Szilárd formában lassan (kb. 2 óra alatt) adagolva hozzáadtuk a korábban előállított azidot (13) (4,21 g, 20,6 mmól). Ezt követően a reakcióelegyet 0 $^{\circ}\text{C}$ -

ra hűtöttük és (~150 ml) hexánt adtunk hozzá. Barna anyag vált ki az oldatból, melyet szűrtünk és hexánnal mostunk. Az így kapott anyagot acetonitrilben feloldottuk, majd aktív szén és kevés szilikagél hozzáadásával derítéssel tisztítottuk. Végtermékként sárga színű anyag keletkezett. Termelés: 2,12 g (58%).

^1H - NMR 300 MHz (DMSO- D_6): δ 10.53 (bs, 1H); 8.00 (s, 1H); 7.57 (6Hz, d, 1H); 6.98 (6Hz, d, 1H)

HPLC-MS R_t = 2,32 perc

Tisztaság: 92%

(ES): m/z = 177 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 175 $[\text{M}-\text{H}]^-$

*2-Bróm-7-ciano-4,5-dihidro-4-oxo-tieno[3,2-*c*]piridin (15) előállítása (4. ábra e):*

A gyűrűzárt terméket (14) (1,615 g, 9,17 mmól) dimetil-formamid/jégecet 1:1 arányú elegyében (40 ml) feloldottuk, majd N-brómszukcinimidet (3,22g, 18,12 mmól) adtunk az oldathoz. A reakcióelegyet 80 °C-on kevertettük 12 órát. A szobahőmérsékletre visszahűtött oldatot (~200 ml) desztillált vízre öntöttük. Szürke színű, csapadékos oldat keletkezett. A pH-t telített nátrium-hidrogén-karbonáttal 8 körülire állítottuk, majd a terméket szűrtük és vízzel mostuk. Vákuum alatt szárítottuk. Világosbarna anyag keletkezett. Termelés: 2,048 g (87%).

^1H - NMR 300 MHz (DMSO- D_6): δ 12.42 (bs, 1H); 8.29 (s, 1H); 7.69 (s, 1H)

HPLC-MS R_t = 3,04 perc

Tisztaság: 94%

(ES): m/z = 255 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 253 $[\text{M}-\text{H}]^-$

*2-Bróm-7-ciano-4-klór-tieno[3,2-*c*]piridin (16) előállítása (4. ábra f):*

A kiindulási vegyületet (15) (2,048 g, 8 mmól) foszfor-oxikloridban (25 ml) elszuszpendáltuk és reflux hőmérsékleten keverettük 12 órán keresztül. Az oldatot lehűtöttük és tízszeres feleslegű jégre öntöttük. Barna színű anyag vált ki. Ezt le-szűrtük, vízzel majd telített nátrium-hidrogén-karbonáttal és ismét vízzel mostuk. Vákuum alatt szárítottuk. Termelés: 2,1 g (95%).

^1H - NMR 300 MHz (DMSO- D_6): δ 8.86 (s, 1H); 8.01 (s, 1H)

HPLC-MS R_t = 4,24 perc

Tisztaság: 99%

(ES): m/z = 273 $[\text{M}+\text{H}]^+$

*3-[(2-Bróm-7-ciano-tieno[3,2-*c*]piridin-4-il-amino)]-piperidin-1-karbonsav-*t*-butilészter (17) előállítása (4. ábra g):*

A kiindulási vegyületet (16) (2,1 g, 7,68 mmól) vízmentes dioxánban (40 ml) feloldottuk, majd hoz-

záadtunk 1,7 g (8,4 mmól) 1-tercbutoxi-karbonil-(S)-3-aminopiperidin-t és kálium-karbonátot (2,1 g, 15,36 mmól) az oldathoz. A reakcióelegyet 80 °C-on kevertettük 12 órát. Ezt követően szűrtük, az oldószert rotációs vákuumbepárlóval eltávolítottuk és a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottuk hexán/etil-acetát 1:1 arányú elegyét használva eluensként. Világosbarna kristályos anyag, termelés: 2,025 g (60%).

HPLC-MS R_t = 4,92 perc

Tisztaság: 94%

(ES): m/z = 437 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 435 $[\text{M}-\text{H}]^-$

*3-[7-Ciano-2-(3,5-difluor-fenil)-tieno[3,2-*c*]piridin-4-il-amino]-piperidin-1-karbonsav-*t*-butilészter (18) előállítása (4. ábra h):*

A kiindulási brómvegyületet (17) (0,98 g, 2,24 mmól) dimetoxi-etánban (17 ml) feloldottuk és argon bevezetése mellett 1 órán keresztül kevertettük 0,5 g (0,43 mmól) palládium[0]-tetrakis-trifenilfoszfin katalizátor jelenlétében, majd hozzáadtunk 0,53 g (3,38 mmól) 3,5-difluorfenil boronsavat. 2,3 g (6,83 mmól) Cézium-karbonátot feloldottunk 6 ml desztillált vízben és lassan hozzáadtuk a dimetoxi-etán-os oldathoz. Ezt követően 80 °C-ra melegítettük a rendszert és egy éjszakán át kevertettük argon bevezetés mellett. A kivált katalizátort (palládium) kiszűrtük, majd a terméket acetonitrilből kristályosítottuk ki. Sárga színű anyagot kaptunk. Termelés: 0,245 g (24,5%).

HPLC-MS R_t = 5,42 perc

Tisztaság: 97%

(ES): m/z = 471 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 469 $[\text{M}-\text{H}]^-$

*2-(3,5-Difluor-fenil)-4-(piperidin-3-il-amino)-tieno[3,2-*c*]piridin-7-karbonsavamid (1) előállítása (4. ábra i):*

A kiindulási vegyületet (18) (0,245 g, 0,52 mmól) 14 ml tömény sósavban feloldottuk és szobahőmérsékleten kevertettük 12 órát. A reakcióidő letelte után 40 ml desztillált vizet csepegtettünk az oldathoz és a pH-t telített nátrium-karbonáttal 10-11 körülire állítottuk. A kivált anyagot szűrtük és vízzel mostuk, majd szárítottuk. Az anyagot feloldottuk etil-acetátban és sósav sóként preparáltuk pár ml sósavas etil-acetát hozzáadásával. Fehér színű terméket kaptunk. Termelés: 90,5 mg (41%, sósav sóként számolva).

^1H - NMR 300 MHz (DMSO- D_6): δ 8.55 (s, 1H); 8.34 (s, 1H); 7.91 (bs, 1H); 7.49-7.20 (m, 5H); 4.12-4.08 (m, 2H); 3.09-3.03 (m, 2H); 2.84-2.72 (m, 2H); 1.96 (bs, 1H); 1.65-1.47 (m, 3H)

HPLC-MS R_t = 2,34 perc és 2,51 perc

Tisztaság: 93%

(ES): m/z = 389 $[M+H]^+$; 387 $[M-H]^-$

3-[7-Ciano-2-(4-klórfe-nil)-tieno[3,2-c]piridin-4-il-amino]-piperidin-1-karbonsav-t-butil-észter (19) előállítás (4. ábra j):

A kiindulási brómvegyületet (17) (1 g, 2,28 mmól) dimetoxi-etánban (17 ml) feloldottuk és argon bevezetése mellett 1 órán keresztül kevertettük 0,5 g (0,43 mmól) palládium[0]-tetrakisz-trifenilfoszfin katalizátor jelenlétében. A komplex képződés után hozzáadtunk 0,35 g (2,28 mmól) 4-klórfe-nil boronsavat a rendszerhez. 2,3 g (6,83 mmól) Cézium-karbonátot feloldottunk 6 ml desztillált vízben és lassan hozzáadtuk a dimetoxi-etán-os oldathoz. Ezt követően 80 °C-ra melegítettük a rendszert és egy éjszakán át kevertettük argon bevezetése mellett. A kivált katalizátort (palládium) kiszűrtük, majd a terméket acetonitrilből kristályosítottuk ki. Sárga színű anyagot kaptunk. Termelés: 0,178 g (17,8%).

HPLC-MS R_t = 5,52 perc

Tisztaság: 89%

(ES): m/z = 469 $[M+H]^+$; 467 $[M-H]^-$

2-(4-Klórfe-nil)-4-(piperidin-3-il-amino)-tieno[3,2-c]piridin-7-karbonsavamid (2) előállítás (4. ábra k):

A kiindulási vegyületet (19) (0,178 g, 0,38 mmól) 10 ml tömény sósavban feloldottuk és szobahőmérsékleten kevertettük 12 órát. A reakcióidő letelte után 30 ml desztillált vizet csepegtettünk az oldathoz és a pH-t telített nátrium-karbonáttal 10-11 körüli-re állítottuk. A kivált anyagot szűrtük és vízzel mostuk, majd szárítottuk. Fehér színű ter-

mékét kaptunk. Termelés: 78,26 mg (53%).

1H - NMR 300 MHz (DMSO- D_6): δ 9.54 (bs, 1H); 8.93 (bs, 1H); 8.55 (s, 1H); 8.52 (s, 1H) 7.77 (9Hz, d, 2H); 7.53 (9Hz, d, 2H); 4.69 (m, 1H); 3.5-3.03 (m, 2H); 3.16-3.09 (m, 4H); 2.08-2.04 (m, 2H); 1.92-1.85 (m, 2H)

HPLC-MS R_t = 2,36 perc és 2,55 perc

Tisztaság: 95%

(ES): m/z = 387 $[M+H]^+$; 385 $[M-H]^-$

IRODALOM

1. Bogoyevitch, M.A., et al.: Drug Discov Today 12, 622-632 (2007).
2. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S.: Science 298, 1912-1934 (2002).
3. Kumar, R., Gururaj, A. E., Barnes, C.J.: Nat Rev Cancer 6(june) 459-471 (2006).
4. Gururaj, E.A., Rayala, K.S., Kumar, R.: Breast Cancer Res. 7, 5-12 (2005).
5. Lei, M., Robinson, M.A., Harrison, S.C.: Structure 13, 769-778 (2005).
6. Knaus, U.G., Bokoch, G.M.: Int. J. Biochem. Cell. Biol. 30, 857-862 (1998).
7. Lim, L., Manser, E., Leung, T., Hall, C.: Eur. J. Biochem. 242, 171-185 (1996).
8. Bokoch, G.M.: Annu. Rev. Biochem. 72, 743-781 (2003).
9. Jaffer, Z.M., Chernoff, J.: Int. J. Biochem. Cell Biol. 34, 713-717 (2002).
10. Sells, M. A., Chernoff, J.: Trends Cell Biol. 7, 162-167 (1997).
11. Chunling, Y., Maksimoska, J., Marmorstein, R., Kissil, J.: Biochem. Pharm. 80, 683-689 (2010).
12. Bordas, B., Belai, I., Lopata, A., Szanto, Z.: J. Chem. Inf. Model. 47, 176-185 (2007).
13. Thomsen, R. et al.: J. Med. Chem. 49, 3315-3321 (2006).
14. Schrödinger Suite 2009 and 2010, Schrödinger, LLC., Licence owner: Rational Drug-Design Laboratory – Co-operation Research Centre, Semmelweis University, Budapest, Hungary.
15. WO 2006106326 A1 (2006)

[Érkezett: 2010. november 22.]

A magyar gyógyszerkiadások nagyságának értékelése

INOTAI ANDRÁS^{*1,2}, MERÉSZ GERGŐ³, KALÓ ZOLTÁN^{2,4}

¹Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet, Budapest, Hőgyes E. u. 9. – 1092

²Syreon Kutató Intézet, Budapest, Thököly út 119. – 1146

³Eötvös Loránd Tudományegyetem, Társadalomtudományi Kar, Egészségpolitika és Egészség-gazdaságtan Tanszék, Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A. – 1117

⁴Eötvös Loránd Tudományegyetem, Társadalomtudományi Kar, Egészség-gazdaságtani Kutatóközpont, Budapest, Pázmány Péter sétány 1/A. – 1117

*Levelezési cím: inotai.andras@gytk.sote.hu

Summary

Összefoglalás

Inotai, A., Merész, G., Kaló, Z.: *Assessment of the pharmaceutical expenditure in Hungary*

Scarcity of health care resources draws attention to the expenditure on pharmaceuticals, as drugs are considered to be one of the major growth drivers of health care spending. This article assesses the Hungarian expenditure on pharmaceuticals by taking into account the economic status of the country and benchmarks from other OECD countries with special focus on indicators of Visegrad V4 countries (Czech Republic, Slovakia, Poland and Hungary). Our results highlight the heterogeneity of pharmaceutical expenditure data derived from different indicators among observed countries. Pharmaceutical spending is relatively higher in middle-income countries, mainly due the price convergence of innovative drug's, on contrary manpower cost of health care services are adjusted to local price levels, therefore the price differential of health care services between middle income and developed countries is greater. International trends of the global pharmaceutical market are also valid in Hungary. Increased private funding, mainly out of pocket payments above the average of V4 countries, has been the major growth driver of pharmaceutical expenditure recently in Hungary. Increased private pharmaceutical expenditure was mainly derived from the severe cost-containment measures in 2006. The annual growth rate of the National Health Insurance Fund's pharmaceutical budget for drug reimbursement was 1.37% in real terms between 1994 and 2009. This is much beneath the expansion of global pharmaceutical market. Consequently, cost-containment of public pharmaceutical spending was very successful in the last fifteen years, and the burden of market growth has been shifted to households. Public health programmes, investment into preventive care, with consideration on unfavourable Hungarian morbidity and mortality indicators, however, necessitate the increase of public pharmaceutical budget. In order to improve the allocative efficiency of health care spending, available resources should be spent only on effective, cost-effective, economically affordable medicines.

Keywords: pharmaceutical expenditure, price convergence, international price referencing, cost-containment of public pharmaceutical spending.

A gyógyszerekre fordított kiadások növekedése sokak szerint az egészségügyi kiadások növekedésének egyik motorja, ezért a gyógyszerkiadások alakulását a fejlett országokban a korlátozott erőforrások dilemmájának tükrében megkülönböztetett figyelem kíséri. Jelen tanulmány célja a hazai gyógyszerkiadások nagyságának értékelése egyrészt a hazai lehetőségek, másrészt a hasonló gazdasági fejlettségű, végül pedig a többi OECD ország adataival összevetve. Eredményeink alapján elmondható, hogy a gyógyszerkiadásra vonatkozó egyes mutatók tekintetében az egyes országok között jelentős eltérés tapasztalható. A gyógyszerekre fordított kiadások relatív aránya az alacsonyabb fejlettségű országok között magasabb, mivel az innovatív gyógyszerek ára ezekben az országokban is a szűk globális ársávban mozog, az egészségügyi szolgáltatások árának jelentős részét kitevő bérköltség pedig alacsonyabb. A gyógyszerpiac nemzetközi tendenciái hazánkban is érvényesek. Bár a visegrádi országokon belül Magyarország gyógyszerkiadási mutatói meghaladják az átlagot, az utóbbi években a különbség nagyrészt a gyógyszerekre fordított magánkiadások jelentős mértékéből eredeztethető. A gyógyszerekre fordított magánkiadások növekedésének hátterében a 2006. végi kiadáskorlátozó egészségpolitikai és finanszírozói intézkedések állnak. Az OEP gyógyszerkassza növekedése 1994-2009. között reálértéken évente 1,37%-os volt, amely elmarad a gyógyszerpiac globális növekedési ütemétől. Ez azt mutatja, hogy az elmúlt 15 évben a hazai közkiadások kontrollja igen erőteljes volt a gyógyszerek piacán, melynek fő elemeként a terheket a lakosság vállára helyezték át térítési díjak formájában. A népegészségügyi programok megvalósítása, a prevenció szemlélet előtérbe kerülése esetén, valamint a hazai morbiditási és mortalitási adatok miatt hosszú távon el kell fogadnunk a gyógyszerkiadások növekedését. Hangsúlyozni kell azonban, hogy a növekvő gyógyszerkiadások mögött igazolt költséghatékonyságú, bizonyított eredményességű, finanszírozható gyógyszeres terápiák kell, hogy álljanak.

Kulcsszavak: gyógyszerkiadások, szűk globális ársáv, nemzetközi árreferencia rendszer, gyógyszer-közkiadások kontrollja.

Háttér

A gyógyszerekre fordított kiadások növekedése sokak szerint az egészségügyi kiadások növekedésének egyik motorja, ezért a gyógyszerkiadások alakulását a fejlett országokban a korlátozott erőforrások dilemmájának megjelenését követően megkülönböztetett figyelem kíséri [1]. Hazánkban is időről időre [2, 3] felmerülő kérdés, hogy indokolt-e a hazai gyógyszerkiadások aktuális szintje.

Célok

Jelen tanulmány célja a hazai gyógyszerkiadások nagyságának értékelése egyrészt a hazai lehetőségek, másrészt a hasonló gazdasági fejlettségű, végül pedig a többi OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) tagország adataival összevetve. Nem foglalkozik azonban az elemzés a gyógyszerkiadások nagyságának értékelésén belül a gyógyszerfelhasználás minőségi szempontjával, vagyis annak a kérdésnek a megválaszolásával, hogy az adott összegű gyógyszerkiadás felhasználásának allokatív hatékonyságát hogyan lehetne javítani. Ez a témakör messze túlmutat jelen dolgozat keretein.

Módszerek

Nyers adataink az *OECD Health Data 2010* adatbázisból származnak. Az adatgyűjtés során a legfrissebb elérhető (2008-as) adatokat alkalmaztuk. Ahol ez nem állt rendelkezésre, ott 2006-ig visszamenőleg kerestünk adatokat. A vizsgált országok csoportját az európai és észak-amerikai kontinens OECD tagországai alkották. Kizártunk azonban minden 300.000 főnél kisebb országot. Hollandiára vonatkozóan az utolsó három évből nem sikerült adatot lekérnünk, így ez az ország nem szerepel az elemzésünkben.

A gyógyszerpiac sajátosságai miatt az adatokat nem vásárlóerő paritáson (USD/PPP), hanem USD-ben adtuk meg. Ennek három fő oka van:

- Az innovatív gyógyszerek helyi vásárlóerőhöz igazított differenciált (azaz Ramsey szerinti) árképzése megszűnt, melynek a fő oka az Európai Unióban támogatott parallel kereskedelem és a széles körben alkalmazott nemzetközi árreferencia rendszer [4]. A gyógyszergyárak által meghatározott szűk globális ársáv miatt az innovatív gyógyszerek esetén a főbb valuták vásárlóereje az innovatív gyógyszerek fogyasztói kosarában országonként nem eltérő.

- A generikus gyógyszerek esetében sem a vásárlóerő határozza meg az árakat, hanem az adott ország gyógyszerpolitikai döntései. Például azokban az országokban, ahol hatóanyag alapú gyógyszerfelírás van (ld. Nagy-Britannia), a generikus gyógyszerek árai alacsonyabbak, mint pl. a kelet-európai országokban.
- Az OEP is hivatalos valutaárfolyamon euróban kéri a gyógyszerárakat a referencia országokra vonatkozóan a gyógyszerek társadalombiztosítási támogatására vonatkozó kérelemben [5].

Az OECD országok adatainak előzetes elemzésekor egyértelműen megfigyelhető volt, hogy az egyes országok között jelentős különbségek láthatók a gazdasági fejlettségben. Az eltérő gazdasági fejlettségű országok eredményeinek összevetése téves következtetéshez vezet, hiszen a szegényebb országok (alacsonyabb egy főre eső GDP) is közel azonos globális áron kénytelenek finanszírozni a modern gyógyszerek iránti szükségletüket. Az elemzés során megkülönböztetjük a fejlett (GDP/fő > 30.000 USD) és a közepesen fejlett (GDP/fő < 30.000 USD) országokat. Az összes országra kiterjedő előzetes értékelés mellett a visegrádi országok (Magyarország, Lengyelország, Csehország és Szlovákia) klaszterét külön is elemeztük, és az eredményeket a négy ország számtani átlagához viszonyítjuk.

Mivel az OECD adatbázisában a vizsgált országok jelentős részére nem állt rendelkezésre adat a gyógyszerkiadásokra (még kevésbé az OTC és vényköteles bontásban) önállóan, ezért a járóbeteg ellátásban igénybevett gyógyszer- és gyógyászati segédeszköz (GYSE) kiadásokkal számoltunk. Vizsgálatunk tehát felülbecsüli a gyógyszerkiadásra vonatkozó adatokat a gyógyászati segédeszköz kiadások mértékével, és alulbecsüli a kiadásokat a kórházi ellátás részeként lekönyvelt gyógyszerkiadások mértékével. A magyar gyógyszer-támogatás idősoros elemzésére szolgáló OEP adatokból le tudtuk válogatni a GYSE kiadásokat. Az egyes kiadási tételeket (összes egészségügyi kiadás, gyógyszer és GYSE kiadás) köz- és magánkiadások szempontjából is megvizsgáltuk. A nagyszámú vizsgált ország és származtatott mutatószám miatt az adatmennyiség kezelhetőségét előtérben tartva a nemzetközi összehasonlítás döntően keresztmetszeti vizsgálattal történt.

Statisztikai elemzés

Az eltérő gazdasági fejlettségű ország csoportok értékeit Mann-Whitney-Wilcoxon-próbával hasonlítottuk össze. Ez a módszer kis minták esetén is

I. táblázat

A vizsgált országok alapadatai (Forrás: OECD Health Data 2010)

	Egy főre jutó GDP (USD, 2008)	Egy főre jutó egészségügyi kiadás (USD 2008)		Egy főre jutó gyógyszer és egyéb GYSE kiadás (USD 2008)		
		összes kiadás	magánkiadás	összes kiadás	közkidás	magánkiadás
Norvégia	94568	8075	1276	615	328	287
Írország	62918	5500	1269	951	709	242
Svájc (2007)	57504	6093	2493	628	425	203
Dánia (2007)	56974	5550	861	475	265	210
Izland	52608	4777	801	665	338	327
Svédország	51937	4879	884	643	373	269
Finnország	51038	4282	1103	619	344	274
Ausztria	49743	5215	1205	696	466	230
Belgium	48197	4932	1354	811	481	330
Egyesült Államok	47193	7538	4031	897	294	603
Kanada	45185	4691	1398	806	310	497
Franciaország	44785	4996	1110	820	545	275
Németország	44700	4714	1096	710	544	166
Egyesült Királyság	44320	3838	667	452	382	70
Olaszország	39170	3545	808	651	307	344
Spanyolország	36125	3240	890	665	485	180
<i>Fejlett országok átlaga</i>	<i>51685</i>	<i>5117</i>	<i>1328</i>	<i>694</i>	<i>412</i>	<i>282</i>
Görögország (2007)	27713	2679	1062	666	526	140
Szlovénia	27101	2257	626	422	250	172
Észtország	17539	1073	222	222	95	127
Portugália (2006)	18358	1823	519	397	222	175
Csehország	21059	1498	261	305	188	117
Szlovákia	17555	1374	426	387	276	111
Magyarország	15368	1119	324	353	200	153
Lengyelország	13856	972	269	220	84	135
<i>Visegrádi országok átlaga</i>	<i>16960</i>	<i>1241</i>	<i>320</i>	<i>316</i>	<i>187</i>	<i>129</i>
<i>Közepesen fejlett országok átlaga</i>	<i>19819</i>	<i>1599</i>	<i>464</i>	<i>372</i>	<i>230</i>	<i>141</i>

lehetővé teszi a két csoport összevetését. A statisztikai döntéseknél 5%-os szignifikancia-szintet használtunk, és megadtuk a nem paraméteres konfidencia-intervallumokat is (95%). A próbára vonatkozóan megadtuk a p-értéket. A számításokat az R statisztikai szoftver 2.11.1-es verziójával végeztük [6].

Eredmények

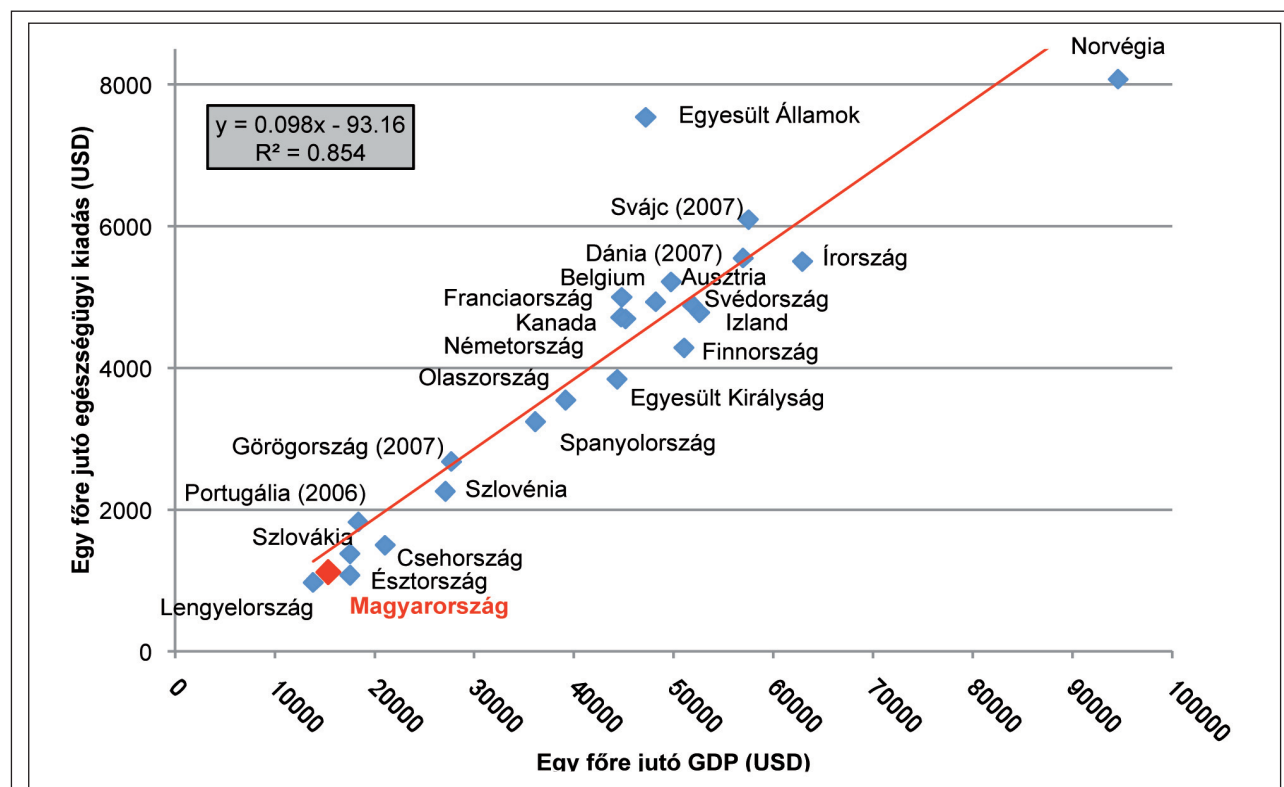
A vizsgált országok alapadatait az I. táblázat, legfontosabb származtatott mutatóit a II. táblázat tartalmazza. Magyarország gyógyszer- és GYSE-kiadásaiban nem éri el a 30.000 USD GDP/fő alatti

országok kiadásainak átlagát annak ellenére, hogy a gyógyszerekre és GYSE-re fordított magánkiadások nagysága az átlagot meghaladó. Ugyanakkor a GDP és a teljes egészségügyi kiadások arányában a gyógyszerkiadások szintje magasnak mondható, melynek oka elsősorban a magán gyógyszer/GYSE kiadások magas szintje. Az egy főre jutó egészségügyi kiadás és egy főre jutó GDP kapcsolatát az 1. ábra mutatja. Jól látható, hogy a két változó között erős ($R^2 = 0,85$) lineárisnak tekinthető összefüggés van. A 2. ábrán az egy főre jutó gyógyszer- és GYSE-kiadás és az egy főre jutó egészségügyi kiadás kapcsolata látható. A lineáris trendvonal helyett jobb illeszkedést sikerült elérni hatványos

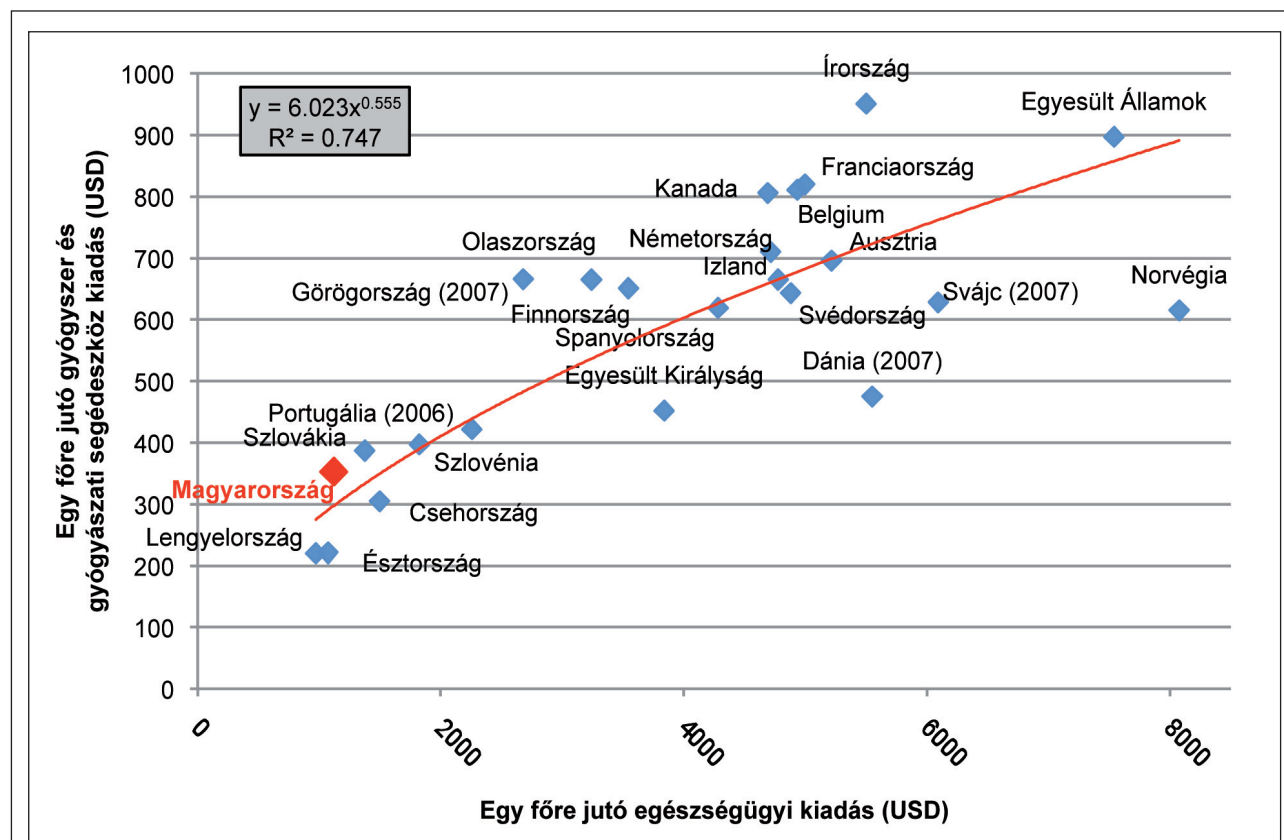
II. táblázat

A vizsgált országok származtatott mutatószámai (Forrás: OECD Health Data 2010)

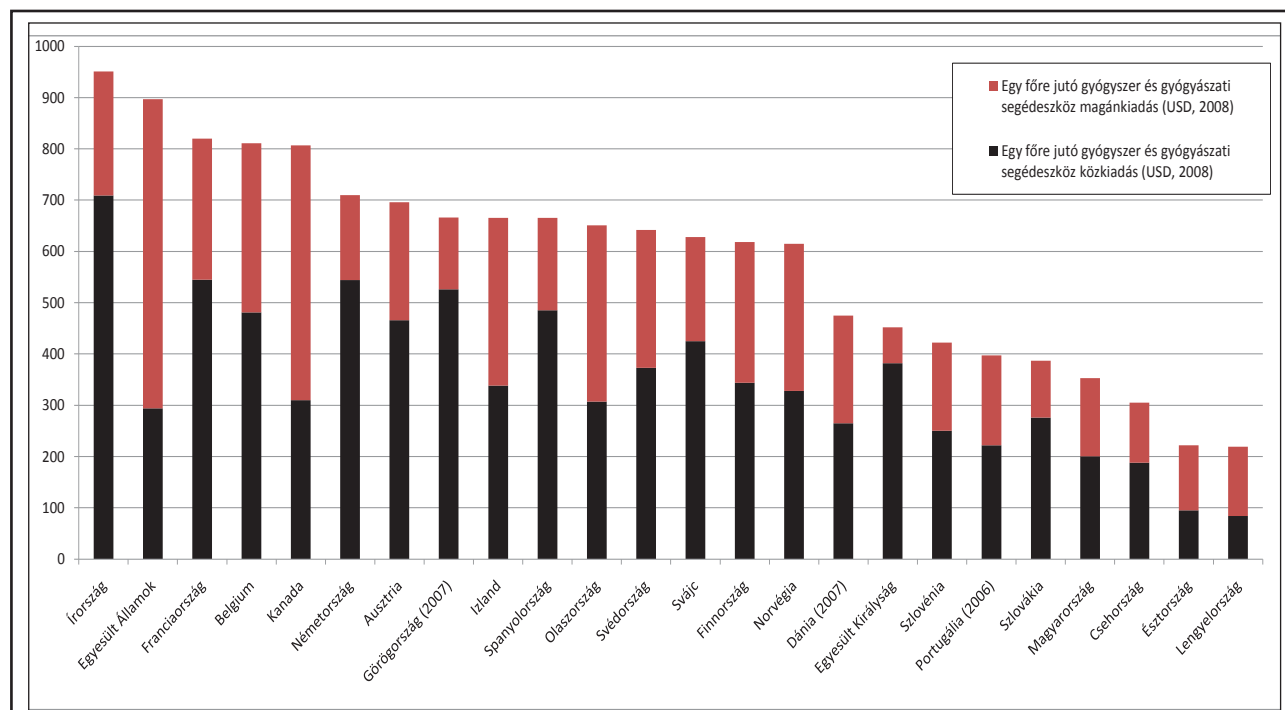
	Egészség- ügyi kiadás	Egészség- ügyi ma- gánkiadás	Összes gyógyszer és GYSE kiadás	Gyógyszer és GYSE közkiadás	Gyógyszer és GYSE magánki- adás	Összes gyógyszer és GYSE kiadás az összes egészség- ügyi kiadás százaléká- ban	Gyógyszer és GYSE magánkiadások aránya	
	a GDP százalékában						a teljes gyógyszer és GYSE kiadás belül	a teljes egészség- ügyi magán- kiadás belül
Norvégia	8,5	1,35	0,7	0,3	0,3	7,60	46,67	22,49
Írország	8,7	2,02	1,5	1,1	0,38	17,3	25,45	19,07
Svájc (2007)	10,6	4,34	1,1	0,7	0,35	10,3	32,32	8,14
Dánia (2007)	9,7	1,51	0,8	0,5	0,37	8,60	44,21	24,39
Izland	9,1	1,52	1,3	0,6	0,62	13,9	49,17	40,82
Svédország	9,4	1,70	1,2	0,7	0,52	13,2	41,84	30,43
Finnország	8,4	2,16	1,2	0,7	0,54	14,4	44,26	24,84
Ausztria	10,5	2,42	1,4	0,9	0,46	13,3	33,05	19,09
Belgium	10,2	2,81	1,7	1	0,68	16,4	40,69	24,37
Egyesült Államok	16	8,54	1,9	0,6	1,28	11,9	67,22	14,96
Kanada	10,4	3,09	1,8	0,7	1,1	17,2	61,66	35,55
Franciaország	11,2	2,48	1,8	1,2	0,61	16,4	33,54	24,77
Németország	10,5	2,45	1,6	1,2	0,37	15,1	23,38	15,15
Egyesült Királyság	8,7	1,50	1	0,9	0,16	11,8	15,49	10,49
Olaszország	9,1	2,06	1,7	0,8	0,88	18,4	52,84	42,57
Spanyolország	9	2,46	1,8	1,3	0,5	20,5	27,07	20,22
Fejlett országok átlaga	10	2,65	1,41	0,83	0,57	14,1	39,93	23,59
Görögország (2007)	9,7	3,83	2,4	1,9	0,51	24,8	21,02	13,18
Szlovénia	8,3	2,31	1,6	0,9	0,63	18,7	40,76	27,48
Észtország	6,1	1,27	1,3	0,5	0,72	20,7	57,21	57,21
Portugália (2006)	9,9	2,83	2,2	1,2	0,95	21,8	44,08	33,72
Csehország	7,1	1,24	1,5	0,9	0,56	20,4	38,36	44,83
Szlovákia	7,8	2,43	2,2	1,6	0,63	28,1	28,68	26,06
Magyarország	7,3	2,11	2,3	1,3	1	31,6	43,34	47,22
Lengyelország	7	1,94	1,6	0,6	0,97	22,6	61,36	50,19
Visegrádi országok átlaga	7,3	1,93	1,9	1,1	0,79	25,7	42,94	42,08
Közepesen fejlett országok átlaga	7,9	2,24	1,89	1,11	0,75	23,6	41,85	37,48



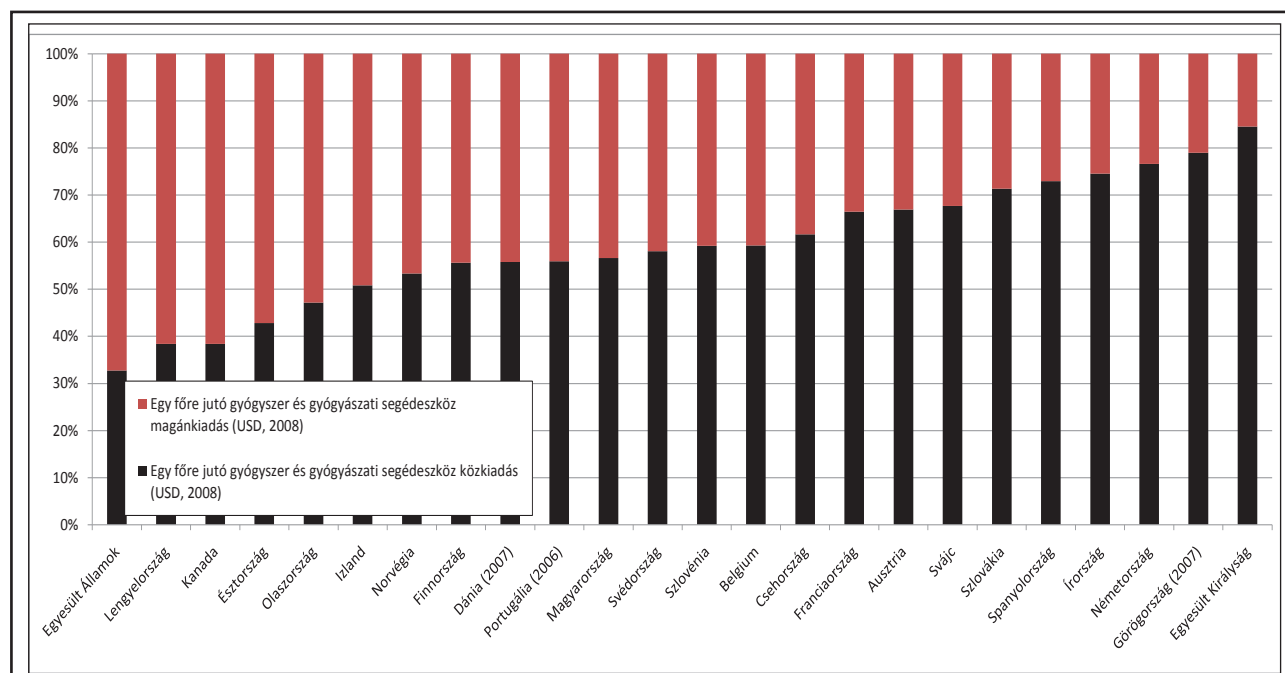
1. ábra: Az egy főre jutó egészségügyi kiadás és az egy főre jutó GDP kapcsolata (Forrás: OECD Health Data 2010)



2. ábra: Az egy főre jutó gyógyszer és GYSE kiadás és az egy főre jutó egészségügyi kiadás kapcsolata (Forrás: OECD Health Data 2010)



3. ábra: Gyógyszer és GYSE közkiadás és magánkiadás értéke (Forrás: OECD Health Data 2010)



4. ábra: Gyógyszer és GYSE közkiadás és magánkiadás százalékos aránya (Forrás: OECD Health Data 2010)

trendvonalal, ami a variancia nagyobb százalékát magyarázza ($R^2 = 0,75$). A trendgörbék alapján megállapítható, hogy Magyarország egészségügyi és gyógyszerkiadási mutatói egy főre kivetítve hozzávetőleg megfelelnek az aktuális nemzetközi tendenciáknak. A 3. ábra az egyes OECD országok gyógyszer és GYSE kiadását mutatja egy főre ve-

títve, közkiadás és magánkiadás szerinti bontásban. A 4. ábra a gyógyszer- és GYSE-kiadásokon belül a köz- és magánkiadások százalékos arányát mutatja az egyes OECD országokon belül. A leg-alacsonyabb gyógyszer- és GYSE-közkiadás aránnyal az USA rendelkezik, figyelemre méltó viszont a lengyel (38%) és észt (43%) adat, ami az

III. táblázat

A 30 000 USD GDP/fő alatti és feletti országok főbb mutatóinak összehasonlítása (Forrás: OECD Health Data 2010)

Vizsgált paraméter		Átlag, GDP 30.000 USD / fő alatt	Átlag, GDP 30.000 USD / fő felett	Különbség (fejlett orszá- gok – közepesen fejlett országok)	Nem paraméte- res konfidencia- intervallum (me- diánra) (95%)	P-érték
Egy főre jutó összes egészségügyi kiadás (USD, 2008)	összes kiadás	1599	5117	3517	2520-4126	<0,001
	magánkiadás	464	1328	864	406-972	<0,001
Egy főre jutó gyógyszer és egyéb GYSE kiadás (USD, 2008)	összes kiadás	372	694	323	229-445	<0,001
	közkidadás	230	412	182	85-287	0,001
	magánkiadás	141	282	140	63-187	<0,001
Egészségügyi kiadás	a GDP száza- lékában	7,90	10,00	2,10	0,70-3,19	0,002
Egészségügyi magánkiadás		2,24	2,65	0,41	(-0,67)-(-0,87)	0,653
Összes gyógyszer és GYSE kiadás		1,89	1,41	-0,48	(-0,8)-(-0,01)	0,039
Gyógyszer és GYSE közkiadás		1,11	0,83	-0,29	(-0,64)-(+0,07)	0,185
Gyógyszer és GYSE magánkiadás		0,75	0,57	-0,18	(-0,42)-(-0,009)	0,046
Összes gyógyszer és GYSE kiadás	az összes egészségügyi kiadás száza- lékában	23,58	14,14	-9,44	(-13,09)-(-5,39)	<0,001
Gyógyszer és GYSE magánkiadás	a teljes gyógyszer és GYSE kiadás száza- lékában	41,85	39,93	-1,92	(-15,31)-(-10,30)	0,928
	a teljes egészségügyi magánkiadás százalékában	37,48	23,59	-13,90	(-26,78)-(-2,69)	0,016

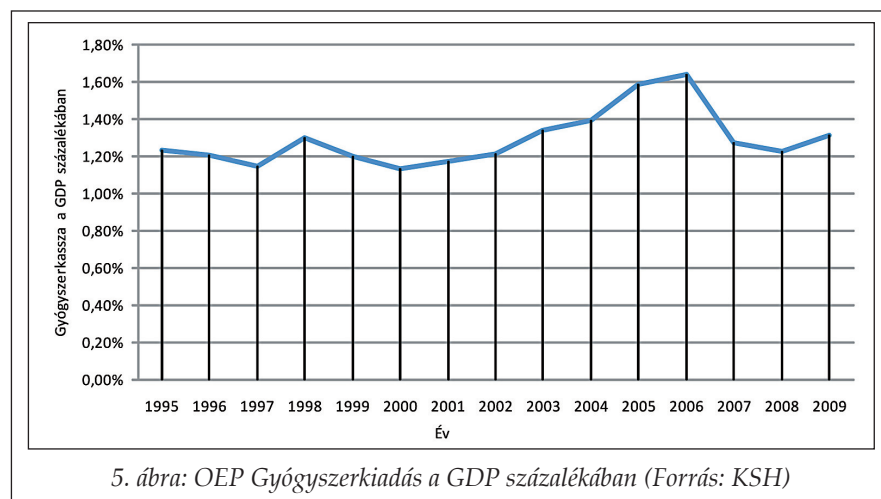
OECD közepesen fejlett országai között példa nélküli. A többi, Magyarországhoz hasonló fejlettségű országban a közkiadások szintje minden esetben meghaladja az 50%-ot, Szlovákiában például a 70%-ot is.

A kiadások szerkezetében meglévő különbség vizsgálata gazdasági fejlettség alapján

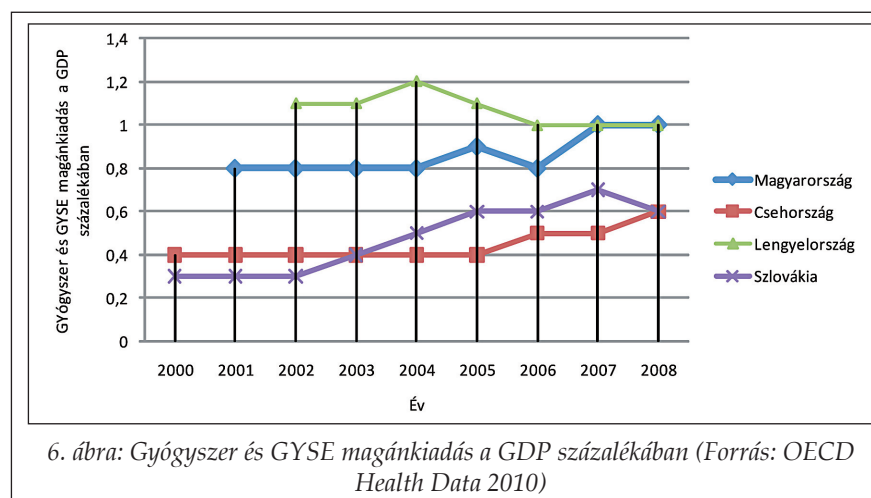
A III. táblázat szerint a fejlett és közepesen fejlett országok egészségügyi kiadásának szerkezetében különbség figyelhető meg. Az egészségügyi magán-, valamint a gyógyszer- és GYSE közkiadások GDP-n belüli százalékos arányát, továbbá a gyógyszer- és GYSE magánkiadások teljes gyógyszer kiadásokon belüli százalékos arányát leszámítva a fejlett és közepesen fejlett országok között valamennyi mutatóban statisztikailag erősen szignifikáns különbséget tapasztalhatunk.

A visegrádi országok klaszterének elemzése

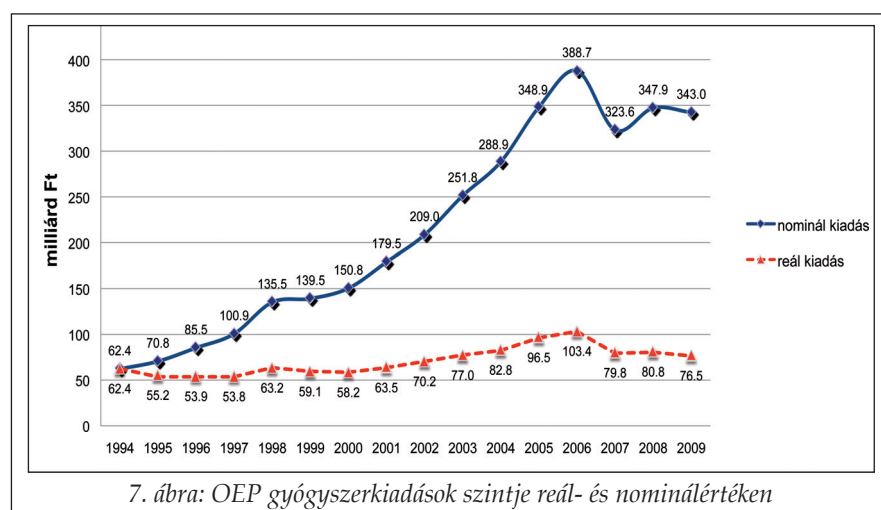
Mivel a gazdaságilag fejlett és közepesen fejlett országok között különbség látható az egyes mutatószámok tekintetében, csak a hasonló fejlettségű országokkal való összehasonlítás eredményez reális képet. Az I. és II. táblázat tónussal kiemelt része a visegrádi országok klaszterének főbb adatait tartalmazza. Az I. táblázat szerint az egy főre jutó egészségügyi kiadás terén a GDP/fő rangsorban is vezető Csehország vezet a visegrádi országok közül, hazánk az átlag alatt helyezkedik el. Egészségügyi magánkiadások terén azonban Szlovákia áll az élen. A teljes gyógyszer- és GYSE kiadás és a közkiadás terén is Szlovákia kiadásai a legmagasabbak (hazánk mindkét esetben a második), ugyanakkor a gyógyszer magánkiadások már Magyarországon a legmagasabbak. A gyógyszerkiadások GDP százalékában vett alakulásáról el-



5. ábra: OEP Gyógyszerkiadás a GDP százalékában (Forrás: KSH)



6. ábra: Gyógyszer és GYSE magánkiadás a GDP százalékában (Forrás: OECD Health Data 2010)



7. ábra: OEP gyógyszerkiadások szintje reál- és nominálértéken

százalékában a legmagasabb a vizsgált négy ország közül hazánkban, azonban jól látható, hogy a gyógyszer- és GYSE magánkiadások mind a teljes gyógyszer- és GYSE kiadás, mind a teljes egészségügyi magánkiadáson belül lényegesen nagyobb százalékos arányt érnek el, mint Szlovákiában (II. táblázat).

Az 5. ábra alapján elmondható, hogy a gyógyszer közkiadások a GDP százalékában a 2000-es évek elejétől, jellemzően 2002-től egyre intenzívebb növekedést mutattak, amelynek csúcsa 2006 volt. Ezt követően egy igen intenzív visszaesés történt. Az időszak végén a gyógyszer közkiadások szintje gyakorlatilag az 1995-ös szinten áll. A 6. ábra azt mutatja, hogy hazánkban 2006-ot követően jelentősen, hozzávetőleg 25%-al, körülbelül a GDP 0,8%-áról a GDP 1,0%-ára növekedtek a gyógyszer- és GYSE magánkiadások. Az OEP gyógyszerkiadások nagysága reálértéken a 2002-2006 közötti dinamikus növekedés ellenére nem nagyon változott az elmúlt 15 évben. 1994-2009 között a gyógyszerkassa reálnövekedése évente 1,37%-os volt, amely messze a világpiac növekedése alatti érték. Fontos megállapítás, hogy a 2009-es OEP gyógyszerkassa reálértéken kisebb, mint a 2003-as kassa nagysága (7. ábra). Összességében az elmúlt 15 évben a hazai közkiadások kontrollja igen erőteljes volt a gyógyszerek piacán, melynek

mondható, hogy bár a gyógyszer- és GYSE összkidadások hazánkban a legmagasabbak, ez a gyógyszer- és GYSE magánkiadások magas arányára vezethető vissza. A gyógyszer- és GYSE közkiadások Szlovákia esetében magasabbak, Magyarország itt a második helyet foglalja el. A gyógyszer- és GYSE összes kiadás az egészségügyi kiadások

fő elemeként a terheket a lakosság vállára helyezték át térítési díjak formájában.

Következtetés

Az I. és II. táblázatból látható, hogy az egyes OECD országok GDP-je, egészségügyi kiadása, egészségügyi

közkiadása, gyógyszer- és GYSE összkiadása, gyógyszerekre és GYSE-re fordított magánkiadása között egy főre vetítve jelentős eltérések tapasztalhatóak. Hasonlóra engednek következtetni a regressziós diagramok (1. és 2. ábra) is. A gyógyszer- és GYSE kiadások szerkezetére vonatkozó adatok (3. és 4. ábra) is jelentős különbségekre utalnak, hiszen a gyógyszer-közkiadásokra vonatkozóan 35% alatti és 80% feletti arányokra is láthatunk példát. Az általános heterogenitás mellett azonban kiolvashatóak bizonyos tendenciák. Amint adataink is igazolják (III. táblázat), a közepesen fejlett országok kevesebbet költenek egészségügyre (egy főre jutó egészségügyi kiadások a GDP százalékában), az egészségügyön belül viszont nagyobb részarányt tesznek ki a gyógyszerkiadások. Ezzel konzisztens, hogy a fejlett országokhoz viszonyítva kisebb egy főre jutó GDP-jük nagyobb százalékát költik gyógyszerre.

Az eltérő gazdasági fejlettségű országok között meglévő különbség az egyes mutatókban azzal igazolható, hogy a szegényebb országokban a humán erőforrás alacsonyabb bérszintje miatt az egészségügyi szolgáltatások az összkiadás kisebb részarányát teszik ki. Mivel a gyógyszerkiadásoknak jelentős része köthető az innovatív gyógyszerekhez, ezek pedig jellemzően a gyártó által meghatározott szűk nemzetközi ársávban mozognak, a gyógyszerkiadások relatív súlya ezekben az országokban nagyobb [7]. Az egyes változókra illesztett trendgörbék alakja, valamint az a tény, hogy ezek hatványfüggvénnyel a variancia nagyobb százalékát magyarázzák a gyógyszerkiadásokhoz kapcsolódó mutatószámok esetében a lineáris illesztéshez képest, szintén igazolja a fenti megállapítást.

A CEMI (*Central European Management Intelligence*) Magyarországra vonatkozó elemzése megállapítja, hogy „Egy főre eső éves gyógyszerfelhasználásunk – vásárlóerő-paritáson mérve – nem csak a régió többi országát, de az OECD átlagát is meghaladja” [8]. A tanulmány nem veszi azonban figyelembe, hogy a gyógyszerkiadások vásárlóerő-paritáson számolt vizsgálata az innovatív gyógyszerek szűk globális ársávja miatt félrevezető. Ugyanezen okból pedig az eltérő gazdasági fejlettségű országok gyógyszerkiadásainak összevethetősége (magyar adatok vs. teljes OECD átlag) szintén megkérdőjelezhető. Több tanulmány megállapította, hogy minél magasabb egy ország GDP-je, a költségvetésből annál kisebb arányban fordítanak a gyógyszerek közfinanszírozására [9, 10]. Az adatokból egyértelműen látható, hogy hazánk a köze-

pesen fejlett országokhoz hasonlóan az átlagosnál többet költ a gyógyszerek közfinanszírozására. Ráadásul a CEMI anyag azt a torzító tényezőt sem veszi figyelembe, hogy bizonyos országokban a gyógyszerkiadások nagyobb hányada válik láthatatlanná az intézményi, azaz kórházi kasszáknak keresztül. Mivel Magyarországon nemzetközi viszonylatban alacsony a kórházi gyógyszerfelhasználás (hiszen a betegek jelentős része a patikai forgalomban kiváltott gyógyszerét szedi a kórházban is) [11], ezért a gyógyszerkiadásunk valós nagysága kevésbé magas az OECD átlaghoz viszonyítva.

A teljes egészségügyi magánkiadások jelentősebb részét teszik ki a gyógyszerre fordított magánkiadások a közepesen fejlett országokban a fejlett országokhoz képest. Ezekben az országokban az egészségügyi magánkiadások GDP-hez viszonyított aránya ugyanakkor elmarad a fejlett országokétól, miközben a gyógyszerek GDP százalékában vett magánkiadása meghaladja a fejlett országok értékét. Ennek magyarázata ismét a gyógyszerek egyéb egészségügyi szolgáltatásokhoz képest magasabb árárányában rejlik a közepesen fejlett országokban a többi egészségügyi szolgáltatáshoz képest.

Magyarországra vonatkozóan kiemelhető, hogy hazánk – a hazai originális gyógyszerfejlesztés korlátozott lehetőségei és a gyógyszeripar tulajdonviszonyai (jellemzően nemzetközi szakmai befektetői tulajdon) miatt – innovatív gyógyszerekből nem önellátó, ezért a nemzetközi gyógyszerpiaci trendek hatása itthon fokozottan jelentkezik. A hazai gyógyszerpiacon egyre inkább a nemzetközi árak dominálnak, a gyógyszerimport aránya 2003-ban már 68% volt [10].

A nemzetközi trendek egyik legfontosabb tényezője, hogy a gyógyszerpiac globálisan nő. Az egyes új gyógyszerek, például onkológiai készítmények növelik a túlélést. A hosszabb ideig élő beteg természetesen nem csak életminőséggel korrigált életév (QALY) nyereséget jelent, hanem ezzel párhuzamosan nőnek az egészségügyi kiadások is, amelynek jelentékeny része a gyógyszerkasszákat terheli.

Az egészségpolitika primer célja a világ egyetlen országában, köztük Magyarországon sem lehet a kiadások csökkentése hosszú távon, hiszen ez esetben a legolcsóbb és legegyszerűbb megoldás a gyógyszerárak felfüggesztése lenne, ami természetesen elfogadhatatlan. Ha viszont elfogadjuk azt, hogy a legfontosabb egészségpolitikai cél a lakosság egészségi állapotának a javítása, azaz a várható élettartam és életminőség növelése

például a kardiovaszkuláris vagy onkológiai megbetegedések területén, akkor el kell fogadnunk azt a kényszert is, hogy ennek ára az egészségügyi kiadások, köztük a gyógyszerkassza növelésében rejlik.

Ennek alapvetően két iránya lehet: a növekedés biztosítása belső tartalékokból, vagy pótlólagos forrásbevonásból. Az előbbi tekintetében a 2006-os és az azt követő gyógyszerpiaci intézkedések nyomán a mozgástér jelentősen leszűkült, a rendszer belső tartalékai lényegében kimerültek, ezért a költséghatékony innovatív gyógyszerek befogadását hosszú távon döntően a kassza növekményből lehet finanszírozni.

A 2006. év végi intézkedések [12] hatása az 5. ábra alapján látható, a GDP arányos gyógyszer közkiadás 1,64%-ról 1,27%-ra csökkent egy év alatt, amely csökkenés mérsékeltebb ütemben, de 2008-ban is folytatódott. A gyógyszer közkiadás a 2006-os drasztikus visszaesést követően nominálisan 2007-8 között lényegében nem változott. Ezzel párhuzamosan a magánkiadások mértéke jelentősen nőtt (6. ábra). A II. táblázat adatai alapján tehát megállapítható, hogy bár Magyarországon bizonyos mutatókat tekintve valóban magas a gyógyszerkiadás, ez 2006 óta nagyrészt a magas gyógyszer magánkiadásoknak köszönhető. Ez a folyamat az 5. és 6. ábra alapján egyértelműen a 2006-os közkiadásokat korlátozó intézkedéseknek köszönhető, amely a gyógyszer közkiadásokat oly módon csökkentette, hogy a gyógyszerellátás terheit igen jelentős részben a lakosságra hárította.

A globális piac növekedésének megkerülhetetlen trendje mellett a másik fontos kiindulási pont a hazai lakosság katasztrofális morbiditási és mortalitási mutatói. Az egészségi állapot javítása kiemelt egészségpolitikai cél, ezzel párhuzamosan azonban fontos cél az egészségügyi ellátórendszer hatékonyságának növelése a kórházi fekvőbeteg szakellátási események számának csökkentésével. Ez utóbbi azonban a gyógyszeres kezelési formák fokozottabb alkalmazását igényli az alapellátásban és a járóbeteg szakellátásban. A betegek célértéken tartása a magas vérnyomás- és cukorbetegségben a terápiahűség és a gyógyszeres terápiák dózísának emelésével érhető el elsősorban, tehát amennyiben az egészségpolitika komolyan veszi ezeket a célkitűzéseket, hosszú távon a gyógyszerkasszában többletforrásra lesz szükség. Ezt az is alátámasztja, hogy bizonyos területeken (pl. koleszterinszint csökkentők, antidepresszívumok) az ezer főre DDD-ben mért gyógyszerfogyasztás mértéke alacsony a magyarországi morbiditási

mutatókhoz képest [13]. A népegészségügyi célok megvalósítása (pl. onkológiai szűrőprogramok) szintén a gyógyszerkiadások növekedésével, és ezzel párhuzamosan hosszú távon jelentkező egészségnyereséggel járnak.

A fenti programok megvalósítása során természetesen a döntéshozóknak az ország gazdasági teherviselő képességére is tekintettel szükséges lenniük. A gyógyszerkiadások értékelése azonban nem lehet kizárólag fiskális szemléletű. Ha a kiadásokat nem szakmai szempontok alapján kontrollálják, előfordulhat, hogy a gyógyszerkassza-szintű kiadáscsökkentés mellett más kasszában, esetleg makroszinten (összes egészségügyi kiadások) is növekmény lehet a kellően nem átgondolt döntés végeredménye [10].

Konklúzió

Összefoglalásul elmondható, hogy a gyógyszerkiadásokra vonatkozó egyes mutatók tekintetében az egyes országok között jelentős eltérés tapasztalható. A gyógyszerekre fordított kiadások relatív aránya a közepesen fejlett országok esetében magasabb, mivel a gyógyszerek ára ezekben az országokban is a szűk globális ársávban mozog, az egészségügyi szolgáltatásokra fordított kiadások jelentős részét kitevő bérköltség pedig alacsonyabb. A trendgörbék alapján megállapítható, hogy Magyarország egészségügyi, gyógyszerkiadási mutatói egy főre kivétítve hozzávetőleg megfelelnek az aktuális nemzetközi tendenciáknak. A gyógyszerpiac nemzetközi tendenciái hazánkban is érvényesek. Bár a visegrádi országokon belül Magyarország gyógyszerkiadási mutatói meghaladják az átlagot, annak hátterében napjainkra a gyógyszerekre fordított magánkiadások jelentős aránya és mértéke áll, melynek fő oka a 2006. év végi kiadáskorlátozó intézkedésekben rejlik. A népegészségügyi programok megvalósítása, a hazai morbiditási és mortalitási adatok, a prevenciós szemlélet előtérbe kerülése miatt rövidebb távon el kell fogadnunk a gyógyszerkiadások növekedését. A gyógyszerkiadásokat nem szabad önmagában vizsgálni, hiszen előfordulhat, hogy a gyógyszerkassza-szintű kiadáscsökkentés mellett más kasszában, esetleg makroszinten is kiadásnövekmény lehet a kellően nem átgondolt döntés végeredménye. Hangsúlyozni kell azonban, hogy a növekvő gyógyszerkiadások mögött igazolt költség-hatékonyságú, bizonyított eredményességű, finanszírozható terápiák kell, hogy álljanak.

Hivatkozások

1. Bodrogi, J., Kaló, Z.: Közgazdaságtan - egészség-gazdaságtan - farmakoökonómia. In: Vincze, Z., Kaló, Z., Bodrogi, J. (szerk.): Bevezetés a farmakoökonómiába. Medicina, Budapest, 2001. pp. 1-5.
2. Magyar Egészségügy Zöld könyv, 2006. 38. old. URL.:http://www.terapia2008.hu/public/downloads/zold_konyv.pdf [Letöltve: 2010.10.12.]
3. Magyar Köztársaság Kormánya.: Magyarország konvergencia programja 2005-2009. Pénzügyminisztérium, 2006. 46. old. URL.:[http://www2.pm.gov.hu/web/home.nsf/portalarticles/CAC3F4F5529CF41AC12571DC00429B43/\\$File/KP_2006_szeptember_final_HU.pdf](http://www2.pm.gov.hu/web/home.nsf/portalarticles/CAC3F4F5529CF41AC12571DC00429B43/$File/KP_2006_szeptember_final_HU.pdf) [letöltve: 2010.10.11.]
4. Kaló, Z.: Innovatív egészségügyi technológiák fejlesztési és befogadáspolitikai kérdései. In: Bodrogi, J. A magyar egészségügy, Társadalmi-gazdasági megfontolások és ágazati véleményterkép, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010. pp. 304-337.
5. Kérelem gyógyszer társadalombiztosítási támogatására. OEP. URL.:<http://www.oep.hu/pls/portal/url/ITEM/1C494E1BDED5E864E040A8C0CB324DEC> [letöltve: 2010.10.11.]
6. R Development Core Team.: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008. ISBN 3-900051-07-0 URL <http://www.R-project.org>. [letöltve: 2010.10.11.]
7. ÁSZ Fejlesztési és Módszertani Intézet.: Gyógyszerfelhasználás és -finanszírozás és az Állami Számvevőszék ellenőrzési tapasztalatai az elmúlt években. Állami Számvevőszék, Budapest, 2004. 71. old. URL.: [http://www.asz.hu/ASZ/tanulmanyok.nsf/0/7D3E5E781484F43FC12574F30031B568/\\$File/t46t.pdf](http://www.asz.hu/ASZ/tanulmanyok.nsf/0/7D3E5E781484F43FC12574F30031B568/$File/t46t.pdf) [letöltve: 2010.10.11.]
8. Central European Management Intelligence.: Makro egyensúly és gazdasági növekedés. Central European Management Intelligence, 2006. 74. old. URL.:http://www.cemi.hu/data/uploadfile/hu_246/phpM2c9oh.Makro%20egyens%20%C3%BAly%20%C3%A9s%20gazdas%20%C3%A1gi%20n%C3%B6veked%C3%A9s.pdf [letöltve: 2010.10.11.]
9. Association of health insurance companies.: Health policy framework for 2006-2010. Association of health insurance companies, Slovakia, 2006. 29. old. URL.:http://www.proroc.sk/images/documents/zakladne_ramce_zdravotnej_politiky_eng.pdf [letöltve: 2010.10.11.]
10. Vitrai, J., Hermann, D., Vizi, J., Csaba, I.: IME Az egészségügyi vezetők lapja. 5, 5-10 (2006).
11. Állami Számvevőszék (ÁSZ, 2007): IME Az egészségügyi vezetők lapja. 6, 5-11 (2007).
12. Gaálné, K.B.: IME Az egészségügyi vezetők lapja. 7, 5-10 (2008).
13. OECD.: Health at a Glance 2009. OECD indicators. OECD Publishing, Paris, 2009. ISBN 978-92-64-06153-8 pp. 109. URL.: www.sourceoecd.org/socialissues/9789264061538 letöltve: 2010.11.02.

[Érkezett: 2010. november 2.]

Az inhalációs kezelés jelentőségéről és az inhalációs eszközökről

KÁDÁR LÁSZLÓ

Pest Megyei Tüdőgyógyintézet, Törökbálint, Munkácsy u. 70. – 2045

Levelezési cím: kad6440@ella.hu

Summary

Kádár, L.: *Importance of asthma inhalation therapy, the used devices*

Worldwide bronchial asthma is one of the most common chronic respiratory disease, having a significant impact on patients quality of life. The aim of asthma management is to reach a well controlled asthma status on long run. Therapeutic guidelines emphasise the importance of drug inhalation therapy. The author emphasises the benefits of inhalation therapy, summarizes the basics of inhalation techniques, reviews the benefits and pitfalls of using the three basic types of inhalers. Finally it is stressed, that patient adherence and patient education is crucial to experience the full clinical benefits at all level of health care providers including the essential role of community pharmacists.

Keywords: inhalation therapy, inhalation devices, patient education.

Összefoglalás

Az asthma bronchiale az egyik leggyakoribb krónikus légúti betegség világszerte, mely jelentősen korlátozza a betegek életminőségét. Az asztma management célja a megfelelő kontrollszint elérése, melynek bázisa az inhalációs terápia. Szerző hangsúlyozza az inhalációs kezelés előnyeit, nem feledkezve meg annak hátrányairól sem. Összefoglalja a gyógyszerek légutakba juttatásának elvi alapjait, ismerteti az inhalációs eszközök típusait, használatuk előnyeit és hátrányait. Hangsúlyozza a beteg-együttműködés és betegoktatás jelentőségét, amely mind a szakorvosi mind az alapellátásban egyaránt fontos és nem nélkülözheti a gyógyszerész jelenlétét.

Kulcsszavak: inhalációs kezelés, inhalációs eszközök, betegoktatás.

Bevezetés

Az asthma bronchialében szenvedő betegek száma rohamosan növekszik. Az asthma bronchiale az egyik leggyakoribb krónikus betegség felnőtteknél és gyermekkorban egyaránt. Bár a terápiában egyre hatékonyabb gyógyszerek állnak rendelkezésünkre, maga a betegség egyelőre nem gyógyítható és jelentős megterhelést jelent a beteg számára, számos szempontból rontva az asztmások életminőségét [1], melyet több hazai felmérés is elemzett [2-8]. Orosz és munkatársainak vizsgálata szerint a felnőtt asztmások esetén a betegség súlyossága, a légzésfunkciós vizsgálat eredménye (FEV₁) és az egyén depressziós státusza befolyásolják elsősorban a betegség specifikus életminőséget, azaz ezen változók az életminőség varabilitásának 52%-át magyarázzák [9].

Az asthmagondozás célja, hogy a beteg asthmája megfelelően kontrollált legyen [10], e cél megvalósításában a betegoktatás alapvető fontossággal bír. A betegoktatás során a rendszeres gyógyszereszedőket képessé kell tenni arra, hogy pontos gyógyszerismereten alapuló döntést hozzanak, továbbá törekednünk kell arra, hogy idő-

ben felismerjük a depresszióra hajlamos egyéneket, akiket fokozott figyelemmel kell kísérni, hiszen a hiányos beteg-együttműködés alapvető probléma a krónikus megbetegedéseknél [11]. A hiányos beteg-együttműködés hatása mind klinikai mind gazdasági szempontból jelentős, hiszen ez esetben a gyógyszeres terápia teljes haszna nem realizálható [12]. Javítani kell tehát az asthmások gyógyszer (inhalátor) használati technikájának hatásfokát, hiszen a hatóanyag szervezetbe juttatása bármilyen inhalátorból megfelelő használati technikát igényel a páciensről, a bevétel precizitása hatással van a terápia potenciális sikerére [12-14].

Az asthma bronchiale kezelésének alapja a gyógyszer-inhaláció, mely az 50-es évektől kezdve terjedt el. Az inhalációs kezelés karrierje annak nyilvánvaló előnyein alapul: a kezelés hatékony, biztonságos és olcsó.

Az inhalációs kezelés előnyei és hátrányai

Az inhalációs kezelés legnagyobb előnye abból fakad, hogy a gyógyszert közvetlenül a célszervbe, a tüdőbe juttatjuk. Ebből következően a kezelés

1. hatékony: kis dózisok elegendőek a kívánt hatás eléréséhez,
 2. gyors: hörgőtágításnál a gyógyszer egyenesen a receptorhoz jut,
 3. biztonságos, mert kevés mellékhatással kell számolnunk, továbbá
 4. a beteg és környezete gyakorlottá válik az inhaláció technikájában, és egyúttal a rohamoldásban is, hiszen annak leghatásosabb módja gyors hatású β_2 -receptor-agonista inhalációja.
- Az inhalációs kezelés hátrányokkal is jár, mert
- eszközigényes,
 - compliance igényes: a beteg aktív vagy passzív együttműködésére van szükség, gyermekkorban a beteg környezetének aktív közreműködését is igényli,
 - bizonytalan a dozírozás: kérdés, hogy a beadott gyógyszerből mennyi jut a tüdőbe.

Az inhalációs kezelés elvi alapjai

Inhalációs gyógyszerbevitel során aeroszolt juttatunk a tüdőbe. Az aeroszol olyan diszperz anyagállapot, mely gázt és benne finoman eloszló folyadékcseppeket és/vagy szilárd anyagot tartalmaz. A mindennapi életben a folyadékkal képzett nedves aeroszolt ködnek, míg a porral képzett füstnek nevezzük. A kettő kombinációja például a nagyvárosi légszennyezés következtében létrejött füstköd (szmog). Az inhalációs kezelés során alkalmazott eszközök egy része ködöt (gyógyszerporlasztó, adagolószelepes inhaler), míg az újabb szerkezetek (porbelégzők) füstöt képeznek. Terápiás célunk az, hogy az aeroszol lehető legnagyobb hányada érje el a tüdő megfelelő receptorokban gazdag részét, ott leülepedjen, majd a bejuttatott gyógyszer a lehető legtovább maradjon a receptorok környezetében. Ez az aeroszol számos tulajdonságától függ. Meghatározó a részecskék alakja, átmérője, a különböző átmérőjű részecskék megoszlása (polidiszperz rendszerekben), az aeroszol higroszkópos tulajdonsága, az aeroszolfelhőben lejátszódó interakciók [15].

Az inhalált részecskék mérete alapvetően meghatározza, hogy azok – megfelelő inhalációs technika esetén – elérhetik-e a tüdőt. A 6 μm -nél nagyobb átmérőjű részecskék gyorsan kiülepsznek az őket sodró légáramból a garat és a nagylégutak falára, ezért nem jutnak el a tüdőig. Az 1 μm -nél kisebb partikulumok nem tudnak leülepedni, így a kilégzett levegő szinte teljes mértékben kisodorja azokat a légutakból. Az inhalációs gyógyszerek tüdődepozíciójának vizsgálatakor a különböző szemcsenagyságú részecskék elkülönítésére elter-

jedten használják az Andersen-féle impaktort. Ez a szerkezet kilenc részecskeátmérő-tartományt képes megkülönböztetni. Egyfelől a 9 μm átmérőnél nagyobb és a 0,4 μm átmérőnél kisebb, valamint a 9; 5,8; 4,7; 3,3; 2,1; 1,1; 0,7 és 0,4 μm -es átmérők közé esőket. A szerzők többsége egyetért abban, hogy a terápiás aeroszolak hasznos részecskénagysága 2,1–4,7 μm közötti. Az inhalációs eszközök egyik fontos paramétere tehát az úgynevezett finomrészecske-tömeg (*fine-particle mass*, FPM), amely arról ad tájékoztatást, hogy a képzett gyógyszer-aeroszolban a szemcsék milyen hányada esik 2,1–4,7 μm közé.

Aeroszolinhaláció során a részecskék jelentős része elvész az inhalációs eszköz és a célszerv közötti úton. Az alábbi pontokon követhető, hogyan változik a gyártó által megállapított dózis, amíg eléri a tüdő receptorait (az első lépés kivételével folyamatosan csökken). A veszteség lehetséges okait zárójelben olvashatjuk.

1. A gyártó által megadott dózis (esetleges pontatlanság a dózis betöltésénél, csak rezevoárral rendelkező eszközöknél kell számításba venni).
2. Az inhalációs eszköz által betöltött dózis (az eszközben: spacerben, adapterben, szájrészben stb. maradt rész).
3. Az eszközből kijutó dózis (a levegőbe, az arcra stb. kerülő rész).
4. Belégzett dózis (a szájban, az orrban, a garatban és a nagylégutakban lecsapódott rész).
5. Tüdőbe jutó dózis ((kilégzett dózis).
6. Hatásos dózis.

A szuszpenziót tartalmazó adagolószelepes inhalerekre – ha a beteg elmulasztja felrázni az eszközt belégzés előtt – nagy pontatlanság jellemző a kimért dózis tekintetében. Ez a pontatlanság rezervoárral működő porinhalátoroknál jóval kisebb mértékű. Tökéletesen begyakorolt eszközhasználat esetén is marad azonban gyógyszer az eszközben. A légkörbe elsősorban gépi porlasztók esetén jut gyógyszer, míg az arcra történő lecsapódás a gépi porlasztók mellett a maszkos-toldalékos adagolószelepes inhalerekre jellemző. A túlságosan nagy (kb. 6 μm -nél nagyobb átmérőjű) és a túlságosan nagy sebességgel belégzett szemcsék nagy része a szájban, a garatban és a nagylégutakban csapódik le. A lecsapódás mértéke függ az aktuális belégzés karakterisztikájától és időtartamától, valamint a felső légutak egyénenként változó geometriájától. Egyes vélemények szerint, ha nagyobb ellenállású belégző segédeszközt használunk, akkor a megerőltető belégzéstől tágul a garat, és ezzel csökken az ott lecsapódott aeroszol-

mennyiség. Az orr szűrő funkciója terápiás aeroszolinhaláció esetén nem kívánatos, mégis számolnunk kell vele, ha maszkkal használunk gépi porlasztót vagy adagolószelepes inhalert. A túlságosan kicsiny (kb. 1 μm -nél kisebb átmérőjű) részecskék döntő hányada a korábban említett ok miatt kilégzésre kerül, így ez a mennyiség a klinikai hatást számottevően nem befolyásolja.

Az inhalációs eszközök három alaptípusa

1. Gépi porlasztók

Aránylag nagyméretű, áramforrást igénylő, drága, kis hatásfokkal üzemelő szerkezetek. A gép zajos, az inhalációs idő hosszú. A modernebb készülékek között vannak kisméretű, halk, akár elemmel működő eszközök is. Ezek alkalmazásának első sorban igen magas áruk szab határt. Szerepük leginkább a hörgőrendszerben felhalmozódó váladék eltávolításában van. A gyermekgyógyászat területén az asthma kezelésében ritkán kerülnek használatra. Felnőtt intenzív osztályokon status asthmaticus ellátása során viszont kedvező tapasztalatokról számoltak be. Előnyük, hogy nem igénylik a beteg együttműködését, segítségükkel több gyógyszert egyszerre porlaszthatunk, illetve, hogy súlyos állapotú beteg ellátása során a porlasztott gyógyszer mellé oxigént adagolhatunk. Fontos tudnunk, hogy míg pl. fiziológiás sóoldat porlasztására bármely gépi porlasztó alkalmas, úgy nagyobb gyógyszermolekulák tüdőbe juttatásához megfelelő rendszert kell választanunk, mivel az ultrahangos porlasztók egy része működése során fizikai károsodást okoz a nagyobb molekulákban, módosítva azok térszerkezetét. Ezért első sorban szteroidok és – egyéb betegségekből alkalmazandó – inhalációs antibiotikumok porlasztása esetén meg kell győződnünk arról, hogy a molekula és a porlasztó kompatibilisek-e.

2. Adagolószelepes inhalerek (spray, pipa)

Az elsőként széles körben elterjedt és ma is használatos eszközök a spray-k (*pressurised metered dose inhaler* – pMDI). Kis méretük és olcsóságuk tette lehetővé az asthmás betegek inhalációs kezelésének világméretű elterjedését. A gyógyszeren kívül koagulációt (a gyógyszerészecskék összecsapódását) gátló felületaktív anyagot, tartósítószer, keletkező kondenzált hajtógázt tartalmaznak. Ez utóbbi adja az aeroszolképzéshez szükséges energiát. Négy hátrányukat kell megemlítenünk:

1. A korrekt sprayhasználat nem egyszerű dolog, mivel a spray elsütését és a belégzést jól össze kell hangolni (*hand-lung coordination*). Ideális esetben az elsütés és a belégzés megkezdése egy időben történik, de az elsütés után 0,2 másodpercen belül a belégzést mindenképpen el kell kezdeni. Ezen felül a belégzést teljes egészében kontrollálni kell. A kívánatos belégzési csúcsáramlás (*peak inspiratory flow rate*, PIFR) 25-90 l/perc között van, ideális esetben 30-50 l/perc. Ennél alacsonyabb és magasabb értékek egyaránt rontják a manőver hatásfokát. Vannak arra vonatkozó adatok, hogy sprayhasználatkor felnőtt betegek akár 200 l/perc-es csúcsáramlást is elérnek [16], és többségük a belégzés során meghaladja a 90 l/perc-es felső határértéket. A feladat bonyolultságát jól érzékelteti, hogy egyes – felnőttekre vonatkozó – adatok szerint (Broeders) asthmások kontrollált belégzését spray használatkor még pontos instrukciókkal sem sikerült javítani.
 2. A spray-t használat előtt mindig fel kell rázni. Ha a felrázás elmarad – ez gyakori hiba – a kiáramló gyógyszer mennyiség csökken, az adagolás bizonytalanná válik.
 3. A spray hajtógáza kis térfogatban helyezkedik el, nagy nyomás alatt. Elsütéskor a kiáramló gáz nyomása gyorsan csökken, térfogata nő. Ez a folyamat hőelvonással jár, amely lehűti a légutakat (hideg freonhatás). A hideg gáz a garathoz érve reflexesen leállíthatja a belégzés folyamatát, a hörgőrendszerbe érve pedig bronchospasmust okozhat.
 4. A spray hajtógáza (hydro-fluoro-alkán, HFA) hozzájárul az üvegházhatáshoz, a Föld légkörének felmelegedéséhez.
- A sprayhasználat hátrányait több újtással próbálták kiküszöbölni az elmúlt évtizedben. Az új, HFA hajtógázos inhalerek a korábbi, chloro-fluorocarbon hajtógázos belégzőkhöz képest kisebb fokú lehűlést okoznak a garatban, így a hideg freon hatás kevésbé jelentős. Egyes inhalerekben (pl. Alvesco, Foster) szuszpenzió helyett oldatba vették a hatóanyagot, így az nem válik ki az oldószerből, ezért a belégző felrázása nem bír olyan jelentőséggel, mint szuszpenziók esetén. A garatban történő lecsapódást minimalizálni igyekeztek a felszabaduló aeroszol sebességének csökkentésével (Respimat). Mindezek a módszerek csak részben érték célját, a valódi probléma megmaradt: a betegek egy jelentős része nem képes összehangolni a spray lenyomását a belégzéssel. Ezt a hátrányt egyféleképpen kerülhetjük el: toldalékhasználat-tal.

A toldalékhasználat előnyei a következők:

- A spray-t be- és kilégző szeleppel ellátott toldalékkal használva a kooperáció igénye minimálisra csökkenthető. Ideális esetben a beteg szájon át, lassan, egyenletesen lélegzik.
- A spray-től távolodó aeroszorból elpárolog a hajtógáz, a maradék a környezet hőmérsékletére melegszik, így a hideg freonhatással nem kell számolnunk.
- Ezen felül a tüdőbe jutó gyógyszer mennyisége is megnő.

Jelenleg szájszutorával és maszkkal ellátott, műanyagból és fémből készült, kis és nagy volumenű toldalékok használatosak a beteg életkorától és kooperációs képességétől függően. A maszkos toldalék használata gyakorlatilag nem igényel együttműködést a beteg részéről, így azt csecsemők és kisdedek kezelésénél választjuk. A műanyagból készült toldalékok falán – azok elektrosztatikus feltöltődése miatt – a befűjt gyógyszer mennyiség nagyobb része csapódik ki és vész el, mint fém toldalék esetén. A nagy térfogatú toldalékok jobb hatásfokúak, mint kisebb térfogatú társaik, de használatukkor figyelembe kell venni, hogy szelepük általában nehezebben mozog (erősebb belégzést igényelnek). Kisebb életkorban maszkos, kis és közepes volumenű toldalékokat (aerochamber, optichamber, babyhaler, NES spacer), míg ötéves kor felett nagy volumenű maszk nélküli toldalékokat (Volumatic) használunk. Tisztában kell lennünk azal is, hogy a befűjt aeroszol – a választott gyógyszerrel függően – műanyag toldalékban kb. 10 másodpercig, míg fém toldalékban kb. 30 másodpercig stabil, így a kiszíváshoz nagyobb légzőtérfogat (*tidal volume*) szükséges. Éppen ezért nagy volumenű toldalékokat csak hároméves kor fölött használunk. A hazánkban megvásárolható toldalékok egy kivétellel (NES spacer) műanyagból készülnek. A toldalék hatékonyságát az említetteken felül befolyásolja a be- és kilégző szelepek minősége.

A toldalékhasználat hátrányai:

1. A toldalékhasználat egyik fő hátránya az, hogy a betegnek egy kényelmetlenül nagyméretű tárgyat kell magával hordania.
2. Maszkkal ellátott toldalékok esetében problémát okoz, hogy a gyermekek elsősorban orron át lélegeznek be, és az orrüreg – teljesítve elsődleges funkcióját – a belélegzett aeroszol jelentős részét kiszűri.
3. Kisdedeknél emellett gyakori probléma a túl szapora, felületes, lihegő légzés, míg nagyobbaknál a túl erőteljes belégzés okoz gondot.
4. A gyermekek egy része nehezen szokja meg a

maszk használatát, fejét rángatva nehezíti az inhalációs kezelést.

5. Csecsemőknél és kisdedeknél a maszk arcra helyezésekor néhány másodperces apnoe jelentkezhet, amely rontja az inhaláció hatásfokát, hiszen műanyag toldalékban mindössze kb. 10 másodpercig stabil a gyógyszer aeroszol.
6. A toldalékok belégző és kilégző szelepe közti rész – ami maszkos toldaléknál a maszk belső térfogatával is kiegészül – holt térnek minősül, mely annál nagyobb dózisvesztést okoz, minél kisebb a beteg légzőtérfogata. Tudnunk kell, hogy minél kisebb gyermeknél alkalmazunk spray kezelést, a képzett aeroszol annál kisebb hányada éri el a tüdőt.

3. Porbelégzők

A porinhaláció ötlete az asthma kezelésében nem újdonság. Már az 50-es évek óta próbálkoznak szteroidpor inhalációjával. A modern porbelégzők kifejlesztésével a gyártók a sprayhasználat hátrányainak kiküszöbölését célozták meg. A porbelégzőkben a gyógyszer nagyobb részecskéiben tárolódik önmagában vagy vivőanyaggal kevert állapotban. Az erőteljes belégzés keltette turbulens áramlás oszlatja el a nagyobb szemcséket finom részecskéik halmazává. A belégzéshez szükséges az erőteljes, mély légvétel, ezért ezeket az eszközöket 5-6 éves kor fölött tudjuk használni.

Előnyei:

1. Használatukat könnyű megtanulni. Nincs szükség sem az elsütés és belégzés összehangolására, sem hajtógázra, hiszen a belégzés keltette légáram hozza létre az aeroszolt, amely ezzel a légárammal együtt le is sodródik a tüdőbe.
2. Használatukat könnyebb megtanítani.
3. Ellentétben a sprayhasználattal, itt nem egyenletes áramlásra, hanem maximálisan erős belégzésre van szükség a hatásfok optimalizálásához. Ez előny és egyben hátrány is. Előny, hiszen a maximális erő kifejtés eléréséhez kevesebb kontrollra van szükségünk, mint a lassú, egyenletes, nem túl gyenge, de nem is túl erős belégzés eléréséhez. Hátrány azért, mert a betegek az otthoni rutin során elkényelmesednek és már nem hajtják végre maximális erővel a belégzést.
4. Környezetet károsító anyagokat nem bocsátanak ki.

Hátrányaik:

1. A betegek fent említett elkényelmesedése egy bizonyos – eszközfüggő – PIFR érték alatt rontja a manőver hatásfokát.

2. Drágábbak, mint a spray-k.
3. Még újak, világszerte nem terjedtek el annyira, mint a spray-k, így helyes használatuk kevésbé közismert. Egy New Jersey-ben végzett vizsgálat szerint a különböző egészségügyi dolgozók átlagosan 78%-ban ismerték helyesen a spray használatot, míg a Diskus®-használatra vonatkozó kérdésekre 63,2%, a Turbuhaler®-használatra vonatkozó kérdésekre pedig 52,4% tudta a helyes választ. Mindhárom eszközt összevetve, az eszközhasználat bemutatása során legjobb eredménnyel a szakorvosok végeztek, őket sorrendben a háziorvosok, gyógyszerészek, nővérek és a rezidensek követték. Külön figyelmet érdemel, hogy az eszközökről legkevesebbet (52%) a nővérek tudtak [17]. Ennek a ténynek az ismerete igen fontos minden légúti betegekkel foglalkozó gyermekosztályon, hiszen ezeken az osztályokon nővér végzi az inhalációs kezelést.

Az inhalációs eszközök összehasonlításának nehézségei

Az inhalációs eszközök vizsgálatánál leginkább arra kíváncsiak, hogy az adott eszközből *in vitro* és *in vivo* körülmények között a gyártó által megállapított dózis mekkora része hasznosul a tüdőben. Ez az adat ugyan nagy súllyal bír, azonban csupán egy a gyógyszer hatásosságát meghatározó tényezők közül. Mégis, mint azt látni fogjuk, a klinikai válasz interpretálásának nehézségei miatt kitüntetett szereppel bír. Ha a klinikai válaszra vagyunk kíváncsiak, az gyors hatású β_2 -receptor-agonista esetében percekben belül mérhető (hörgőtágító hatás). Mégsem egyszerű a helyzet, hiszen a korrekt ítélet dózis-hatás görbe felvételét kívánja meg. Ehhez olyan betegekre van szükség, akiknek reverzibilis bronchospasmusuk van, mely az adott gyógyszerrel dóziszfüggően oldható [16]. Olyan betegeket kell tehát beválasztani a tanulmányokba, akik minél több hörgőtágítót kapnak, annál jobban oldódik bronchospasmusuk. Ez azért nehéz feladat, mert az asztmások zöme a terápiás tartományban adott hörgőtágítóra maximális broncholysisel válaszol [16]. Gyermekpopulációban ilyen betegeket találni még nehezebb, mint felnőttek között. A tanulmányok jelentős részében a szerzők nagy dózisok hatását vizsgálják, így a dózis-hatás görbe meredeken felívelő szakaszának vizsgálatára nem nyílik lehetőség. Porbelégzők összevetésénél problémát jelent, hogy két eszköz összehasonlítása akkor ideális, ha

ugyanazt a gyógyszert, ugyanabban a dózisban tartalmazzák [16]. A gyógyszergyártók saját molekuláikat általában saját inhalációs eszközükben teszik hozzáférhetővé, nehezítve a direkt összehasonlítást. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy klinikai tanulmányok esetén laboratóriumi körülmények között történik a gyógyszerinhaláció a légzés egyidejű monitorozásával úgy, hogy a beteg – saját légzési görbéjét követve a monitoron – kontrollálja a légzését [17]. Ez befolyásolja a belégzési manővert és eltávolítja a tanulmányt a való élettől. Látjuk tehát, hogy hörgőtágító gyógyszerek esetén milyen nehézségekkel kell szembenézni. Ezek a nehézségek hatványozódnak inhalációs szteroidok esetén, ahol a dózis-hatás görbe ellapult, a hatás hetek múlva várható és megítélése sokkal problematikusabb.

Összefoglalás

A maximális terápiás hatékonyság, a megfelelő asztmakontroll-szint eléréséhez elengedhetetlen a beteg együttműködése. Az asztma inhalációs kezelése speciális ismereteket igényel mind a beteg, mind az egészségügyben dolgozók részéről. Az inhalátorok megfelelő használata alapvető fontosságú a betegség kontrolljához szükséges mennyiségű gyógyszer tüdőbe juttatásához. Csak széleskörű tájékozottságon alapuló információ átadással lehetséges a betegek igényeit kielégíteni, és segíteni őket abban, hogy megfelelő minőségű, teljes életet élhessenek.

IRODALOM

1. Mészáros, Á.: Életminőség vizsgálatok In: Czirják László: Klinikai Immunológia. Medicina 2006; 442-445.
2. Mészáros, Á.: Acta Pharm Hung 75, 95-99 (2005).
3. Mészáros, Á.: Tüdőgyógyászat 7, 32-36 (2007).
4. Mészáros, Á.: LAM, 16, 353-359 (2006).
5. Mészáros, Á.: Med Anonym, 3, 27-29 (2003).
6. Meszaros, A., Bartfai, Z., Major, T., Magyar, P., Mesko, A., Vincze, Z.: Allergologie 26, 225-230 (2003).
7. Mészáros, Á., Vincze, Z.: Orv Hetil 144, 423-442 (2003).
8. Meszaros, A., Zelko, R., Mesko, A., Vincze, Z.: Qual Life Res 14, 191-195 (2005).
9. Orosz, M., Gálfi, G., Kovács, D., Ágh, T., Mészáros, Á.: Medicina Thoracalis, 18, 275-281 (2010).
10. GINA guideline 2010: The Global Initiative for Asthma works. <http://www.ginasthma.com> 2010. november 29.
11. Ágh, T., Mészáros, Á.: Acta Pharm Hung 80, 75-80 (2010).
12. Ágh, T., Mészáros, Á.: Orv Hetil, 150, 1497-1502 (2009).
13. Mészáros, Á.: Gyógyszerár 3, 16-18 (2002).
14. Meszaros, A., Orosz, M., Magyar, P., Mesko, A., Vincze, Z.: Allergy, 58, 624 (2003).
15. Lötval, J., O'Byrne, P.: BioDrugs 12, 279-289 (1999).
16. Agertoft, L., Pedersen, S.: Amer J Resp Crit Care 168, 779-782 (2003).
17. Chopra, N., Oprescu, N., Fask, A., Oppenheimer, J.: Ann Allerg Asthma Im 88, 395-400 (2002).

Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

Közlésre elfogadunk:

1. Összefoglaló közleményeket, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. Közleményeket, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. Rövid közleményeket, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

A kézirat elkészítésének módja:

a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revellé, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: J. Pharm. Sci. 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rácz I., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): Chiral Separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31-68.

Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences. Eur. J. Pharm. Sci. 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásvolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábián P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdey-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábián P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szervetlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadók.

b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A dolgozat címe (esetleg alcíme).

A szerző(k) teljes neve (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) munkahelye teljes postai címe, valamint a levelező szerző e-mail címe.

A dolgozat magyar nyelvű összefoglalása.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

Kulcsszavak: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat címe angol nyelven, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

Angol nyelvű összefoglalás.

Bevezetés, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

Key-words: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

Kísérleti rész, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

Eredmények.

A dolgozatot csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

Az eredmények értékelése.

Ábracímek.

Következtetések. Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges köszönetnyilvánítások.

Irodalomjegyzék.

